



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA**

GUSTAVO CORREIA BASTO DA SILVA

**EFEITOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS *IN VIVO* DA INDUÇÃO
CARCINOGENICA COM O 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO**

CAMPINA GRANDE

2014

GUSTAVO CORREIA BASTO DA SILVA

**EFEITOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS *IN VIVO* DA INDUÇÃO
CARCINOGENICA COM O 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel
em Odontologia, pelo curso de
Odontologia da Universidade
Estadual da Paraíba – UEPB –
Campus I – Campina Grande – PB.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daliana Queiroga de Castro Gomes

CAMPINA GRANDE

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586e Silva, Gustavo Correia Basto da.
Efeitos clínicos e histopatológicos in vivo da indução
carcinogênica com o 4-Nitroquinolina-1-Óxido [manuscrito] /
Gustavo Correia Basto da Silva. - 2014.
35 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas
e da Saúde, 2014.
"Orientação: Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes,
Departamento de Odontologia".

1. Neoplasias bucais. 2. Carcinogênese. 3. 4NQO. I. Título.
21. ed. CDD 616.994

GUSTAVO CORREIA BASTO DA SILVA

EFEITOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DA INDUÇÃO CARCINOGENICA
COM O 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO EM RATOS WISTAR

APROVADO EM: 26/11/14

BANCA EXAMINADORA



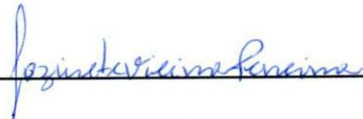
Profª. Drª. Daliana Queiroga de Castro Gomes (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (1º Examinador)

Universidade Estadual da Paraíba



Profª. Drª. Jozinete Vireira Pereira (2ª Examinadora)

Universidade Estadual da Paraíba

*A Deus, meu pai e mestre, a quem sempre recorri em todos os momentos, aos ratos
Wistar que muito contribuíram para este estudo, bem como a todos os pacientes
portadores de câncer dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, agradeço ao meu Deus, fonte de toda minha força e renovação, meu tudo. Grato infinitamente por sempre ter estado comigo, traçando metas para minha vida e realizando sonhos que sempre achei impossíveis. Agradeço também aos meus anjos e santos que sempre intercederam por mim junto a Deus.

A minha mãe guerreira e protetora, Dilma Correia, agradeço por tudo. Em especial, pela educação que sempre me deu; por toda vez que chorei em seus braços com medo e sempre tive aquele apoio maternal inesquecível; por nunca ter desistido de mim, mesmo quando eu fraquejei. Te amo muito e sempre vou te amar, mainha!

Ao meu amado pai, Arnaldo Basto, pelo apoio e pela atenção que sempre tive. Muito obrigado pelo carinho e amor que sempre ganhei do senhor e por todo esforço para me formar. Te amo muito!

Ao meu irmão, William Correia, por ter me aturado quando criança e ter me dado o amor fraterno que precisei. Obrigado pelo incentivo nos estudos e, sobretudo, nos concursos públicos. Você é meu espelho, te amo! Aos meus sobrinhos lindos e amados, Igor e Arthur, também agradeço por todo amor sincero de criança.

Aos meus avós, Ana Gomes e Antônio Correia (*in memoriam*), Helena Basto e José Basto pela torcida e pelo amor que sempre me deram. Aos demais familiares, tias, primos e cunhada, agradeço pela torcida e pelo apoio.

Agradeço a minha dupla, Hugo Japyassú, pelo companheirismo acadêmico, paciência, solidariedade e amizade durante o curso. A minha grande amiga, Ana Li, pelo apoio, paciência e amizade verdadeira que sempre me deu. Aos meus amigos Washington, Guimarães, Michel, Rosane, Pedro, Ana Luíza, Jefferson Paulo, Marta e Irwin pela doce amizade que me oferecem, pela palavra amiga e pela companhia agradabilíssima.

A minha orientadora, Daliana Queiroga, pelos ensinamentos acadêmicos e metodológicos, pela paciência e pela ajuda na realização deste trabalho. A todos os

meus professores, do pré-escolar à universidade. Grato pelo compartilhamento do saber e pelo estímulo do meu crescimento profissional.

Ao CNPq e UEPB pelo incentivo financeiro para realização desta Pesquisa Científica.

Ao professor Cassiano Nonaka pela colaboração na realização deste estudo.

Agradeço também a todos que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Sr. Paulino pela ajuda na parte experimental do estudo no biotério e a Denise e Ana Luzia, técnicas do laboratório de Patologia Oral da UEPB, pela orientação nas etapas laboratoriais.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos clínicos e histopatológicos nas línguas de ratos Wistar, após a indução carcinogênica com o 4NQO. Foi realizado um estudo *in vivo* após aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética Experimental da FCM-CG. A amostra foi composta por nove ratos mantidos, sob temperatura e condições adequadas, divididos em três grupos (A, B e C), de acordo com o tempo de indução (5, 6, 7 meses), respectivamente. As aplicações do carcinógeno foram realizadas quatro vezes por semana no biotério da UFCG e, após estas aplicações, os ratos eram privados de água durante cinco horas, para maior absorção do agente carcinogênico. A análise dos dados foi obtida por meio estatístico-descritivo da frequência clínica e histopatológica das lesões detectadas, constatando-se o aparecimento de lesões ulceradas e pigmentadas em região anterior da língua, bem como displasias e carcinomas. Após análise clínica e histopatológica, concluiu-se que o 4NQO é um indutor carcinogênico eficaz no desencadeamento das fases da carcinogênese.

Palavras-chave: Neoplasias bucais; Carcinogênese; 4-Nitroquinolina-1-Óxido.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the clinical and histopathological effects in Wistar rats language, after carcinogenic induction with 4NQO. An in vivo study after approval of the research by the Experimental Ethics Committee of FCM-CG was carried out. The sample consisted of nine rats kept under suitable temperature conditions and divided into three groups (A, B and C), according to the induction time (5, 6, 7 months), respectively. The applications of the carcinogen were held four times a week in the vivarium UFCG and after these applications, the rats were deprived of water for five hours, for greater absorption of carcinogenic agent. Data analysis was obtained by statistical and descriptive means of clinical and histopathological frequency of detected lesions, having noticed the appearance of ulcerated and pigmented lesions in the anterior region of the tongue, as well as dysplasia and carcinomas. After the clinical and histopathologic analysis, it was concluded that the 4NQO is effective in inducing carcinogenic initiation phase of carcinogenesis.

Keywords: oral cancer; carcinogenesis; 4-nitroquinoline-1-oxide.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

INCA: Instituto Nacional do Câncer	14
CCE: Carcinoma de Células Escamosas	14
HPV: Papilomavírus Humano	14
DBMA: 7,12 dimetilbenzoantraceno	14
4NQO: 4-Nitroquinolina-1-Óxido	14
FPT: Pacientes fora de possibilidades terapêuticas	18
MEC: Matriz Extracelular	18
4HAQO: 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido	19
DNA: Ácido Desoxirribunucleico	19
FCM-CG: Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande	21
CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde	21
UFCG: Universidade Federal de Campina Grande	21
UEPB: Universidade Estadual da Paraíba	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Subdivisão do grupo conforme o tempo de exposição ao 21 carcinógeno.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de lesões bucais clinicamente detectáveis pela indução carcinogênica.	25
Tabela 2: Distribuição das lesões histopatológicas.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto clínico de língua sem alteração clínica	23
Figura 2: Aspecto clínico de língua com alteração leucoplásica	24
Figura 3: Aspecto de língua com mancha em região anterolateral	24
Figura 4: Aspecto de língua com ulceração no terço médio	24
Figura 5: Fotomicrografia de displasia epitelial leve em animal	26
Figura 6: Fotomicrografia de displasia epitelial moderada em animal	26
Figura 7: Fotomicrografia de displasia epitelial severa em animal	27
Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas em animal	27

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	CÂNCER BUCAL	17
3.2	INDUÇÃO CARCINOGENICA	18
4	METODOLOGIA	21
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
4.2	POSICIONAMENTO ÉTICO DA PESQUISA	21
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRA	21
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
4.5	ANALISE DOS DADOS	22
5	RESULTADOS	23
5.1	LESÕES CLINICAMENTE DETECTÁVEIS	23
5.2	LESÕES HISTOPATOLÓGICAS	25
6	DISCUSSÃO	29
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32

ANEXO: Aprovação do Comitê de Ética Experimental

1 INTRODUÇÃO

O Câncer tornou-se uma das doenças mais crescentes no mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), espera-se mais de 500 mil novos casos de câncer para o ano de 2014 no Brasil, dentre estes, mais de 14 mil estariam localizados em região bucal, atingindo predominantemente o sexo masculino, o qual ocupa a oitava posição de incidência no país. Os locais mais acometidos pelo câncer bucal são a língua e o assoalho. Histopatologicamente, o carcinoma de células escamosas (CCE) aparece como a mais frequente. Portanto, um diagnóstico precoce, realizado de forma correta, associado a um tratamento adequado, aumenta as chances de um melhor prognóstico (BRENER et al., 2007; BRANDIZZI et al., 2008; BONFANTE et al., 2014; BRASIL, 2014).

De etiologia multifatorial, essa neoplasia é desencadeada por fatores extrínsecos (tabaco e álcool), fatores biológicos (Papiloma vírus Humano - HPV) e os fatores intrínsecos, podendo citar o material genético como principal fator (BITTENCOURT et al., 2004).

Quanto ao tratamento das neoplasias malignas, a intervenção cirúrgica em consonância com o tratamento radioterápico mostra-se bastante efetivo. A quimioterapia pode ser recorrida de maneira complementar, assim como a imunoterapia (TABACOF, 2000; CARDOSO et al., 2005; BRASIL, 2012).

Para melhor esclarecer a carcinogênese e sua associação com fatores externos, várias pesquisas estão sendo realizadas utilizando modelos *in vitro* de indução carcinogênica. Este processo baseia-se na utilização de compostos químicos sobre tecido animal ou cultura de células humanas, com o objetivo de produzir alterações celulares que podem gerar neoplasias, desde hiperkeratoses e displasias, até carcinomas invasivos. Atualmente, as substâncias mais utilizadas para indução do câncer bucal são o 7,12 dimetilbenzoantraceno (DBMA) e o 4-Nitroquinolina-1-Óxido (4NQO). Vários estudos revelam vantagens do 4NQO em relação ao DBMA, especialmente na capacidade de resultar em lesões neoplásicas verdadeiras e não em processos inflamatórios (MONGUETTI et al., 2006; FARIAS, 2006; HENRIQUES et al., 2011).

Diante do que foi relatado, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos clínicos e histopatológicos da indução carcinogênica com o 4-Nitroquinolina-1-Óxido

na língua de ratos Wistar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos clínicos e histopatológicos na língua de ratos Wistar, após a indução carcinogênica com 4-Nitroquinolina-1-Óxido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a carcinogênese na língua dos ratos por meio da aplicação tópica do 4NQO;
- Verificar clinicamente as alterações teciduais produzidas na língua dos ratos pelo 4NQO nos intervalos de 5, 6 e 7 meses;
- Analisar histologicamente as alterações teciduais produzidas na língua dos ratos pelo 4NQO nos intervalos de 5, 6 e 7 meses.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CÂNCER BUCAL

O câncer é o conjunto composto por mais de 100 doenças, que possuem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, o que é denominado metástase, além de ser considerada a segunda maior causa de morte no Brasil. Esta patologia acomete milhões de pessoas no mundo, independente da classe social, sexo ou raça, sendo considerada uma doença dolorosa, incapacitante, mutiladora e, em alguns casos, mortal, quando diagnosticada tardiamente (BRASIL, 2014; BULGARELI et al., 2013; CAMARGO, 2000).

No Brasil, estima-se, para o ano de 2014, mais de 11.000 casos de câncer bucal entre homens e mais de 4.000 em mulheres. Traduzindo, em valores estatísticos, corresponde a um risco estimado de 11,54 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Nas regiões Nordeste e Sudeste, o câncer bucal é considerado o quarto mais frequente, enquanto na região Centro-Oeste é o quinto e nas regiões Sul e Norte é o sexto (BRASIL, 2014).

Dentre os fatores que desencadeiam o aparecimento das neoplasias malignas, o tabagismo e etilismo possuem lugar de destaque por possuírem efeitos demasiadamente destrutivos aos tecidos bucais, além de efeito sinérgico e dose-dependente. Diante destes fatores, uma política de conscientização que vise diminuir o consumo dessas drogas torna-se necessária para reduzir a ocorrência destas doenças, tendo em vista que, diminuindo o número de usuários, conseqüentemente o número de casos será atenuado, além de ser menos dispendioso investir em ações básicas de saúde (JEMAL et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Tem-se discutido a relação do HPV com a etiologia do câncer bucal. É um vírus transmitido, sobretudo, pelo contato bucal, orogenital ou autoinfecção (mucosa-mucosa), quando a relação sexual configura o principal meio de transmissão. A classificação das lesões causadas pela infecção do HPV está dividida de acordo com o potencial oncogênico. Os vírus considerados de alto risco oncogênico para a mucosa bucal são HPV-16 e HPV-18 (NICHOLS et al., 2009; GOON et al., 2009; OSIS et al., 2014; ZONTA et al., 2012).

O diagnóstico precoce é indubitavelmente o fator que está relacionado a um

prognóstico satisfatório, pois, por meio dele, o paciente é conduzido ao tratamento especializado. A desinformação da população, aliada a uma detecção tardia por parte do cirurgião dentista e a falta de campanhas preventivas, que têm por objetivo a orientação da população, corroboram para um prognóstico duvidoso e riscos frequentes de morte, caracterizando um cenário denominado “Pacientes fora de possibilidades terapêuticas” (FPT). Os pacientes denominados FPT são encaminhados para casa e são tratados por drogas de alta potência analgésica para combater sensações dolorosas características dos estágios finais da doença (GUNERI et al., 2005; THOMAZ et al., 2000; SANTOS et al., 2010).

Histopatologicamente, a célula neoplásica é envolta por um estroma arquitetado por vasos sanguíneos, fibroblastos, matriz extracelular (MEC), células inflamatórias e, eventualmente, miofibroblastos. Por muito tempo, o estroma foi considerado um tecido de suporte para as células malignas, porém com base em evidências científicas, este tem sido encarado como um promotor do fenótipo maligno (LÚCIO et al., 2013; DE WEVER et al., 2008).

A abordagem terapêutica para o câncer varia de acordo com a ressecabilidade e localização do tumor, mas a cirurgia aparece como opção principal de tratamento e pode estar associada à quimioterapia e radioterapia. Para o tratamento de carcinomas em estágio avançado, são usadas algumas abordagens: quimiorradioterapia, associada à cirurgia reservada para doença residual ou cirurgia com esvaziamento cervical, seguida de quimioterapia e radioterapia (GALBIATTI et al., 2013; LIANG et al., 2012).

3.2 CARCINOGENESE E INDUÇÃO CARCINOGENICA

A carcinogênese consiste em um processo dinâmico de formação de neoplasias malignas, desde alterações moleculares até a formação de tumores. Estas alterações conduzem à ativação de oncogenes ou à inativação de genes supressores do tumor, as quais coordenam a proliferação, diferenciação, morte por apoptose e estabilidade do genoma – funções essenciais da célula (SILVA et al., 2011).

Como reportado na literatura, este desenvolvimento neoplásico é dividido, histologicamente, em fases, a saber: hiperplasia/hiperqueratose, displasia leve, moderada, e severa; carcinoma *in situ* e carcinoma superficialmente invasivo. As

alterações moleculares presentes em cada fase devem ser elucidadas, objetivando a formulação de novas formas de tratamento, porém torna-se inviável a realização da análise em humanos de cada fase. Diante disso, a utilização de modelos animais se torna conveniente, já que possibilita uma análise minuciosa de cada etapa (HENRIQUES et al., 2011; SILVA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2010).

Salley (1954) relatou pela primeira vez a indução carcinogênica na cavidade bucal de hamsters sírios, utilizando o DBMA dissolvido em acetona. O desenvolvimento da aplicação destes modelos indutores da carcinogênese é de grande importância para o entendimento das bases moleculares e bioquímicas do câncer de boca, pois é possível a observação das alterações genéticas e fenotípicas semelhantes às que ocorrem nos seres humanos (FARIAS, 2006).

O 4-Nitroquinilina-1-Óxido apresenta-se como um carcinógeno sintético, solúvel em água, capaz de induzir a formação dos estágios da carcinogênese. Durante a carcinogênese, há uma redução enzimática do grupo nitro que está presente no anel aromático do 4NQO, produzindo o 4-hidroxiaminoquinolina-N-óxido (4HAQO), o qual é caracterizado como um metabólico carcinogênico. Este pode ser metabolizado pela seril-RNAt-sintetase para formar o complexo seril-AMPenzima, que introduz grupos quinolonas dentro do DNA, fortalecendo o dano ao material genético. O principal efeito causado pelo composto 4HAQO é o estresse oxidativo, desencadeado pela liberação de radicais livres de oxigênio, como peróxidos e superóxidos. Além disso, o 4HAQO reage preferencialmente com resíduos de guanina de DNA, tornando-se semelhante ao observado nas reações dos compostos presentes no tabaco (GAMA et al., 2010; MIAO et al., 2006; MOGNETTI et al., 2006)

Diversos estudos comprovaram a eficácia do 4-Nitroquinolina-1-Óxido em relação ao DBMA, já que o 4NQO produz lesões neoplásicas verdadeiras e não processos inflamatórios, como desencadeados pelo DMBA, como afirmado por Henriques et al. (2011) quando estudaram o efeito do 4NQO nos tecidos de ratos, aplicando a substância indutora quatro vezes por semana durante 2, 3, 4 meses, sendo utilizados 20 ratos da linhagem Wistar (TANG et al., 2004; TANAKA et al., 2002; GANNOT et al., 2004).

Navarro et al. (1994) realizaram um estudo no qual foram descritos os efeitos do 4NQO no palato de 74 ratos Wistar após 1, 2, 3 e 6 meses de aplicação, realizando quatro aplicações semanais para que houvesse o desenvolvimento de alterações nos tecidos dos animais sendo, posteriormente, analisados macro e

microscopicamente. Alterações histopatológicas são observadas no epitélio lingual durante o processo de aplicação, destacando-se hiperplasia, displasia leve, moderada e severa antes da formação do carcinoma invasivo (KANOJIA; VAIDYA, 2007).

Em se tratando do método de aplicação do carcinógeno, observam-se melhores resultados quando o carcinógeno é dissolvido em água. Tentando comprovar esta tese, Tang et al. (2004) desenvolveram um estudo comparativo da incidência de tumores em camundongos que receberam o 4NQO diluído em água ou apenas a aplicação do carcinógeno diretamente na língua dos animais com pincel, durante 3, 4 e 5 meses. Após este tempo, foi observado que todos os animais que receberam a substância diluída em água desenvolveram tumor, enquanto que 5% dos animais que receberam a droga sem diluição apresentaram tumores. Diante disso, autores têm desenvolvido pesquisas comprovando a eficácia do 4NQO como indutor da carcinogênese, porém o mecanismo de ação do 4NQO precisa ser elucidado para que novas formas de tratamento sejam propostas (SILVA, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo transversal, *in vivo*, analítico-quantitativo, por meio da avaliação clínica e histopatológica da indução carcinogênica realizada pelo 4NQO em ratos do tipo Wistar.

4.2 POSICIONAMENTO ÉTICO DA PESQUISA

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética Experimental da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG) e aprovado em 26 de dezembro de 2012, registrado no protocolo: 0025/26122012.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRA

A amostra foi composta por nove animais reproduzidos no biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em condições de temperatura e alimentação favoráveis. Os animais foram distribuídos em três Grupos (A B e C), compostos por três animais cada, de acordo com o tempo de exposição ao carcinógeno 4NQO (5, 6 e 7 meses), baseando-se no estudo de Henriques et al (2011), havendo modificação da metodologia, com aumento no tempo de exposição ao carcinógeno, objetivando simular estágios mais avançados da carcinogênese. Vale ressaltar que um rato do grupo foi a óbito antes do término da pesquisa (Quadro 1).

Quadro1: Subdivisão do grupo conforme o tempo de exposição ao carcinógeno.

GRUPO A	INDUÇÃO DURANTE 5 MESES
GRUPO B	INDUÇÃO DURANTE 6 MESES
GRUPO C	INDUÇÃO DURANTE 7 MESES

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O 4NQO foi diluído em propilenoglicol, obtendo-se uma concentração de 0,05%, sendo aplicados 5 ml no dorso da língua dos ratos com o auxílio de um pincel. Este procedimento foi realizado quatro vezes por semana durante intervalos de tempo variantes de acordo com os grupos (A, B e C), aos quais os animais pertenceram (Quadro 1). Após a aplicação, os ratos foram privados de receber água por cinco horas para melhor absorção do carcinógeno à mucosa bucal.

Depois de realizadas todas as aplicações, os ratos foram eutanasiados, utilizando 5ml de Acepromazina a 0,2% via intraperitoneal. As biópsias, por meio da exérese completa da língua dos ratos, foram realizadas no biotério da UFCG. A partir daí, observou-se clinicamente de maneira minuciosa as línguas removidas e, em seguida, as mesmas foram armazenadas em formol a 10%. Para fixação dos cortes às lâminas, foi seguido o protocolo indicado pelo laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como inclusão em parafina, microtonia e, por fim, coloração das lâminas histológicas com hematoxilina e eosina. Posteriormente, as lâminas foram analisadas por um avaliador com experiência em histopatologia.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados foi obtida por meio estatístico-descritivo da frequência clínica e histopatológica das lesões detectadas.

5 RESULTADOS

5.1 LESÕES CLINICAMENTE DETECTÁVEIS

Dentre as possíveis lesões clínicas detectáveis, a leucoplasia foi a mais significativa. Clinicamente, o Grupo A, que recebeu o 4NQO durante cinco meses, não apresentou, em sua maioria, lesões clinicamente detectáveis, apresentando apenas 33,3% da amostra desse grupo com lesão ulcerada. No Grupo B, áreas leucoplásicas foram encontradas como lesões clinicamente detectáveis em região anterior da língua e, nos demais materiais da amostra do grupo, não foram encontradas lesões visualizadas macroscopicamente. No Grupo C (sete meses de indução), houve predominância de lesões leucoplásicas (Tabela 1). As imagens das amostras estão distribuídas entre as Figuras 1, 2, 3 e 4.



Figura 1: Aspecto clínico de língua sem alteração clínica (Grupo A).



Figura 2: Aspecto clínico de língua com alteração leucoplásica (Grupo B).



Figura 3: Aspecto clínico de língua com mancha em região ânterolateral.



Figura 4: Aspecto clínico de língua com ulceração no terço médio (Grupo A).

Tabela 1: Distribuição das lesões bucais clinicamente detectáveis pela indução carcinogênica.

GRUPO	SEM LESÃO n(%)	LEUCOPLÁSICA n (%)	PIGMENTADA n (%)	ULCERADA n (%)	ERITEMATOSA n (%)
A	2 (66,7%)			1 (33,3%)	
B	2 (66,7%)	1 (33,3%)			
C	1 (33,3%)	2 (66,7%)			

5.2 LESÕES HISTOPATOLÓGICAS

Após a análise histopatológica e classificação da amostra dentro das alterações histopatológicas do epitélio bucal (escores), obteve-se o seguinte achado: no Grupo A houve uma distribuição uniforme, variando em displasia epitelial leve, moderada e severa (Tabela 2), predominância de carcinoma invasivo no Grupo B e carcinoma *in situ* no Grupo C. As imagens das amostras histopatológicas estão distribuídas entre as Figuras 5, 6, 7, 8, 9.

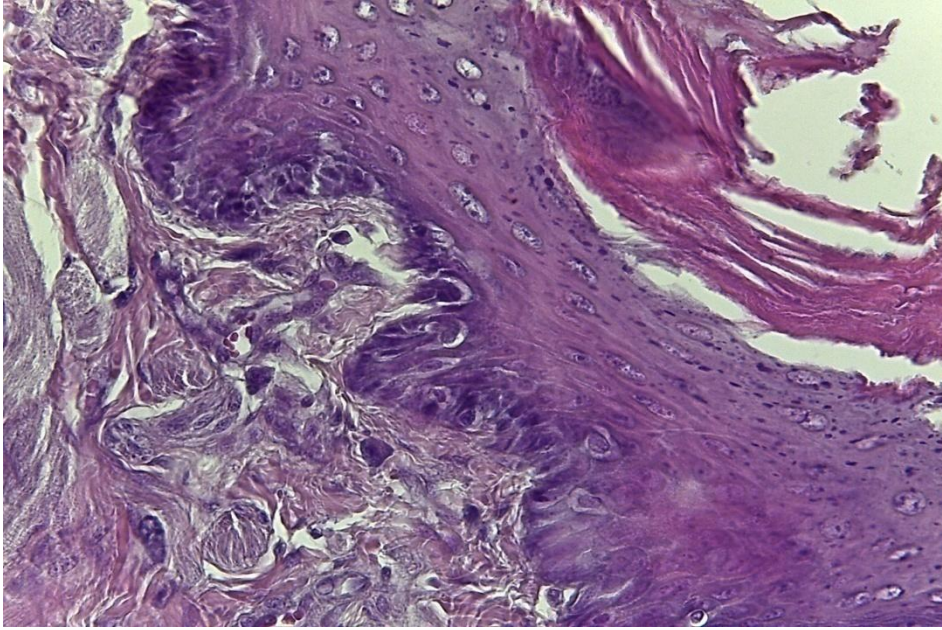


Figura 5: Fotomicrografia de displasia epitelial leve em animal com 5 meses de indução carcinogênica. Destaca-se, no terço inferior do revestimento epitelial, a presença de pleomorfismo celular e hiper cromatismo nuclear (Hematoxilina e Eosina, 400x).

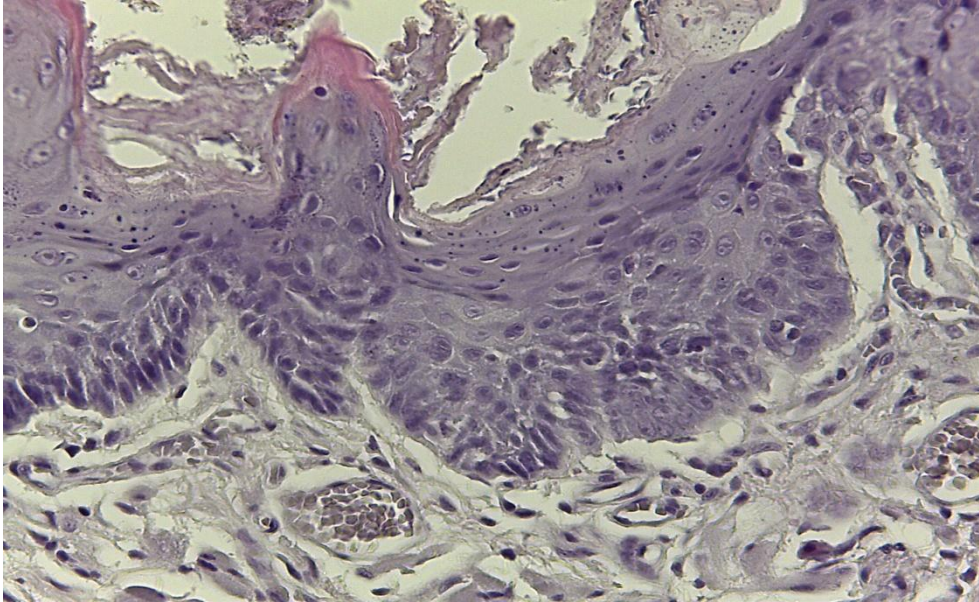


Figura 6: Fotomicrografia de displasia epitelial moderada em animal com 5 meses de indução carcinogênica. Destaca-se, nos terços inferior e médio do revestimento epitelial, a presença de pleomorfismo celular, perda da estratificação epitelial normal e focos de hiper cromatismo nuclear (Hematoxilina e Eosina, 400x).

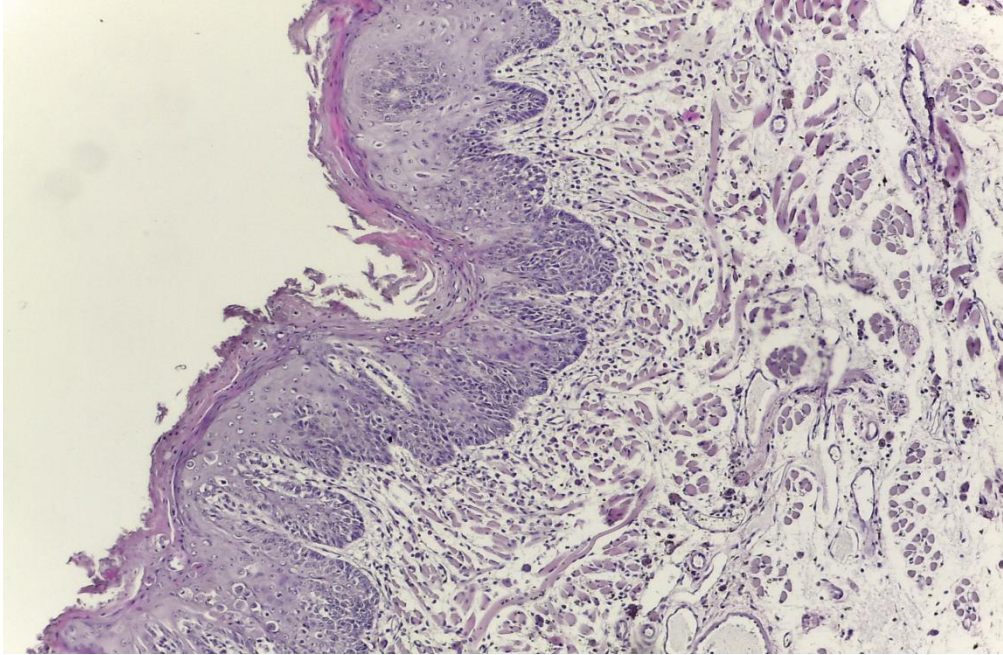


Figura 7: Fotomicrografia de displasia epitelial severa em animal com 5 meses de indução carcinogênica. Destaca-se, do terço inferior ao terço superior do revestimento epitelial, a presença de pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, perda da estratificação epitelial normal e alteração da relação núcleo/ citoplasma (Hematoxilina e Eosina, 100x).

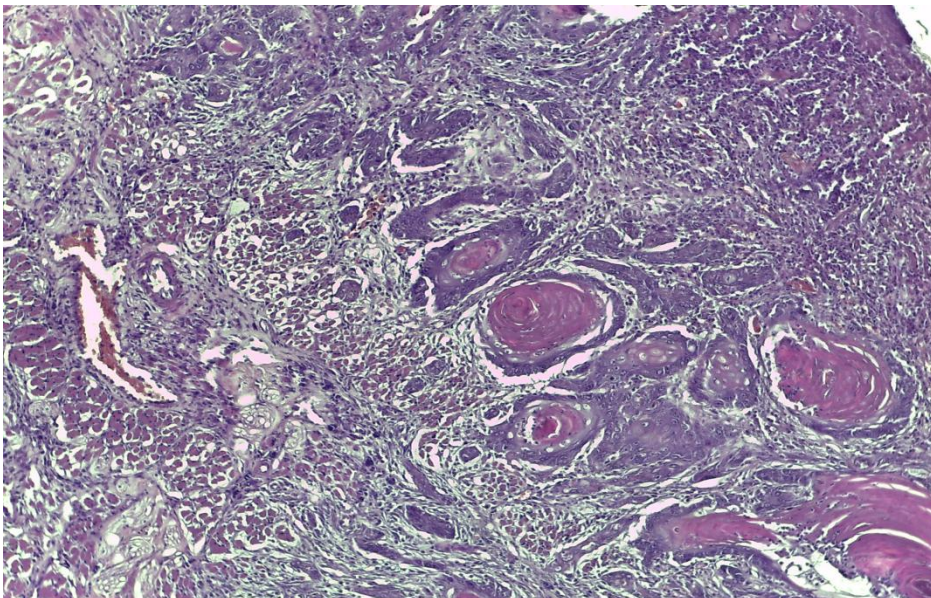


Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas em animal com 6 meses de indução carcinogênica. Destacam-se ilhas e cordões de células epiteliais neoplásicas malignas que invadem o tecido conjuntivo subjacente e dissociam feixes musculares estriados (Hematoxilina e Eosina, 100x).

Tabela 2: Distribuição das lesões histopatológicas.

GRUPO	NORMAL n (%)	H/H n (%)	DEL n (%)	DEM n (%)	DES n (%)	CIS n (%)	CI n (%)
A			1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)		
B						1 (33,3%)	2 (66,7%)
C				1 (33,3%)		2 (66,7%)	

6 DISCUSSÃO

Os modelos com animais possibilitam o desenvolvimento e testes de novas abordagens para a prevenção de doenças e tratamento, identificação de marcadores precoce e de novos alvos terapêuticos. O modelo de indução carcinogênica utilizado neste estudo foi capaz de desenvolver quase todos os estágios da alteração epitelial encontrados na carcinogênese, exceto a hiperplasia/hiperqueratose, intensificando a tese de Henriques et al. (2011), na qual afirmam que o 4NQO é um carcinógeno bastante eficaz, sendo efetuada por meio da indução carcinogênica com o 4NQO em ratos, dentro do intervalo de tempo de 2, 4 e 6 meses. Com base no estudo referenciado, também se verificou a vantagem do 4NQO em relação ao DMBA, porque ao contrário deste que desenvolve resposta inflamatória e necrose, o 4NQO induz efetivamente os estágios da carcinogênese.

Os ratos SpragueDawley foram utilizados em pesquisas anteriores, mas o rato Wistar é o mais encontrado na literatura e foram adotados também nos estudos de Navarro et al. (1994) e Henriques et al. (2011). Foi observada uma compatibilização do presente estudo com o de Navarro et al. (1994) quanto à frequência da aplicação do carcinógeno, ambos realizando-a quatro vezes por semana. Neste estudo, verificou-se também a similaridade entre os tecidos dos ratos e dos humanos, em que há presença de epitélio escamoso estratificado, uma camada de células basais, uma de células espinhosas e outra de células granulares, sendo compatíveis com o epitélio bucal dos seres humanos.

Foram desencadeadas lesões clinicamente visíveis, como lesão leucoplásica e ulcerada (Figuras 2 e 4), corroborando em parte com o estudo de Henriques et al. (2011), não havendo desenvolvimento ulcerativo. No entanto, de acordo com o encontrado em Tang et al. (2004), nem todas as lesões microscópicas foram vistas clinicamente. Diante disso, torna-se bastante importante enfatizar a necessidade de uma ampliação do tempo de indução carcinogênica, para melhor elucidação dos estágios da carcinogênese, além da necessidade do aumento da amostra.

Em concordância com o estudo de Navarro et al. (1994), houve discreta notificação de lesões ulceradas na língua dos ratos Wistar, assim como a similaridade no aparecimento de áreas esbranquiçadas em região anterior de língua. Comparando, minuciosamente, os dois estudos, houve divergência quanto ao tempo

de indução carcinogênica e a lesão estabelecida, pois no presente estudo, a lesão ulcerada foi percebida no grupo com menos tempo de exposição ao carcinógeno, opondo-se ao visto no estudo do autor citado.

No presente estudo, observaram-se apenas lesões pigmentadas e ulceradas, quando comparado com a pesquisa de Navarro et al. (1994), na qual apresentou lesões exofíticas.

Quanto aos achados microscópicos, deve-se ratificar que a proliferação celular é um componente essencial para a carcinogênese e atua na expansão de clones de células iniciadas. Neste estudo, foi possível verificar incidência de displasias, variando da leve à severa, bem como carcinomas. Percebeu-se também que o grau de severidade aumentou conforme o tempo de exposição ao cancerígeno, em acordo com o encontrado no estudo de Ribeiro et al. (2004). No grupo que foi realizada a indução por cinco meses houve achados de displasia e ulceração, já o grupo que recebeu o carcinógeno por seis meses apresentou carcinoma invasivo, como mostrado também no estudo de Henriques et al. (2011).

Vale a pena ressaltar que a maioria das lesões detectáveis ocorreu em região anterior e central da língua. Isso pode ser explicado pelo fato da aplicação do carcinógeno ser feito com pincel e o mesmo ter contato preferencialmente com o terço anterior do órgão e também pela dificuldade de acesso ao terço posterior, em algumas aplicações, já que os ratos eram avessos à aplicação. Fato que não foi observado nos estudo de Henriques et al. (2011), onde apresentou lesões localizadas também em região posterior.

Foram encontradas lesões pigmentadas em região de gengiva e palato, assim como dilaceração lingual em um dos animais e mobilidade dentária. Este fato pode ser explicado pelo fácil escoamento do líquido carcinógeno, devido a sua baixa viscosidade.

Ficou claro o pré-estabelecimento de alterações microscópicas em relação às evidências clínicas, além de confirmar que o efeito da carcinogênese se dá em fases e está relacionada com o tempo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óxido de nitroquinolina configura-se como um efetivo indutor das fases da carcinogênese bucal em modelo animal, desenvolvendo, histologicamente, desde displasias leves, moderadas e severas a carcinomas *in situ* e invasivo, conforme o tempo de exposição ao indutor carcinogênico. É de bastante valia o entendimento das etapas da carcinogênese, subsidiando novos estudos que busquem a prevenção e tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

BITTENCOURT, R et al. Perfil etiológico do câncer na rede pública de Porto Alegre – RS. **Rev Bras. de Cancerol.**v. 50, n. 2, 2004.

BONFANTE, GMS et al. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. **Cad. Saúde Pública.** v. 30, n. 5, Rio de Janeiro, 2014.

BRANDIZZI, D et al. Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v. 13, n. 3, 2008.

BRASIL.Ministério da Saúde. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer oral no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 05/09/14

BRASIL. Ministério da Saúde. **Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 05/09/14

BRENER, S et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Ver. Bras. Cancerol.**v. 55, n. 2, 2007.

BULGARELI, JV et al. Prevenção e detecção do câncer bucal: planejamento participativo como estratégia para ampliação da cobertura populacional em idosos. **Ciênc. Saúde Coletiva.**v. 18, n. 12, Rio de Janeiro, 2013.

CAMARGO, TC. **O existir feminino enfrentando a quimioterapia para o câncer de mama: um estudo de enfermagem na ótica de Martin Heidegger.** (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

CARDOSO et al. Prevenção e controle as sequelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. **Radio Bras,** v. 3, n. 6, 2005.

DE WEVER, O et al. Stromal myofibroblasts in the stroma of oral câncer of invasive cancer growth. **Int J câncer.** v. 123, n. 10, 2008.

FARIAS, PR. **Carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO em línguas de camundongo knockout para gene galectina-3.** (Tese de doutorado) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2006.

GALBIATTI, ALS et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. **Braz. J. Otorinol.**v. 79, n. 2, São Paulo, 2013.

GAMA, RR et al. **Efeitos quimiopreventivos de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 no processo de carcinogênese do trato aerodigestivo superior induzido por 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos suíços.** (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, 2010.

GANNOT et al. Interacion between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-Nitroquinoline-N-oxide in mice. **Oral Oncology**. v. 18, n.3, 2004.

GOON, PK et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head neck oncol**. v. 1, n. 36, 2009.

GUNERI, P et al. Primary oral cancer in a Turkish population sample association with sociodemographic features, smoking, alcohol, diet and dentition. **Oral oncol**. v. 41, n. 10, 2005.

HENRIQUES ACG et al. Análise morfológica da mucosa oral de ratos submetida à carcinogênese experimental pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. v.11, n.1, 2011.

JEMAL, A et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. V. 59, n. 5, 2009.

KANOJIA, D; VAIDYA, MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncology**.v. 23, n. 2, 2007.

LIANG, C et al. Gene-environment interactions of novel variants associated with head and neck cancer. **Head neck**. v. 34, n. 8, 2012.

LÚCIO, PSC et al. Miofibrioplastos e sua relação com o carcinoma de células escamosas oral. **Braz. J. Otorhinolaryngology**. v. 9, n. 1, São Paulo, 2013.

MIAO ZH et al. 4-Nitroquinoline-1oxide induces the formation of cellular topoisomerase I-DNA leavage complexes. **Cancer Res**. v. 66, n. 13, 2006.

MOGNETTI, B et al. Animal models in oral cancer research. **Oral oncology**. v. 42, n. 5, 2006.

NICHOLS, AC et al. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **OtolaryngolheadNecksurg**.v. 140, n. 2, 2009.

OSIS, MJD et al..Conhecimentos e atitudes dos usuários do SUS sobre o HPV e as vacinas disponíveis no Brasil. **Rev. Saúde Pública**.v. 48, n. 1, São Paulo, 2014.

SALLEY, JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **Journal of Dental Research**. Estados Unidos, v. 33, n. 2, 1954.

SANTOS, LCO et al. Caracterização do diagnóstico tardio do câncer de boca no estado de Alagoas. **Braz. J. Otorhinolaryngology**.v. 76, n. 4, São Paulo, 2010.

SILVA, JM. **Participação da quimiocina CCL3 na carcinogênese bucal induzida por 4-Nitroquinolina-1-Óxido**. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

SILVA, LMRB et al. Carcinogênese de cabeça e de pescoço: impacto do pleomorfismo MTHFD1 G1958A. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 57, n. 2, São Paulo, 2011.

SILVEIRA, EJD et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **ExpMolPathol.** v. 88, n. 1, 2010.

TABACOF, J. Quimioterapia. In: Parisi Jr O, ed. Câncer de boca. **Aspectos básicos e terapêuticos.** 1 ed. São Paulo, Sarvier, 2000.

TANAKA et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-Nitroquinoline-1-oxide induced rat tongue carcinogenesis. **Oral oncology.** v. 14, n. 2, 2002.

TANG et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-Treated mice. **Clin Cancer Res.** v. 5, n. 1, 2004.

THOMAZ, EBAF et al. A importância da educação como estratégia para prevenção e diagnóstico precoce do câncer oral. **Rev acta oncológica brasileira.** v. 20, n. 4, 2000.

ZONTA, MA et al. Infecção oral pelo HPV em mulheres com lesão escamosa de colo uterino no sistema prisional da cidade de São Paulo, Brasil. **Braz. J. Otorhinolaryngology.** v. 78, n. 2, São Paulo, 2012.

ANEXO



**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**

PARECER

CEUA: n °11
NÚMERO DO PROJETO: 0025/26122012
APROVADO EM 26/12/2012

- 1. Pesquisador Responsável:**
Duliana Queiroga de Castro Gomes

- 2. Título do Projeto:**
Análise do efeito quimioprotetor e modulador da *Carmellia Sinensis* (L.)Kuntze(Chá Verde) sobre o câncer oral induzido em ratos.

- 3. Objetivo:**
Analisar o efeito da *Carmellia Sinensis*(L.)Kuntze(chá verde) na prevenção e no tratamento de lesões malignas orais induzidas em ratos através da 4-nitroquinolino-1-óxido(4NQO).

- 4. Considerações:**
O projeto apresentado esta bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais. Cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED.

- 5. Parecer Final:**
APROVADO


Tharcia Klara B. Oliveira
Coordenadora CEUA/CESED