



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e  
Clínica Integrada  
ISSN: 1519-0501  
apesb@terra.com.br  
Universidade Federal da Paraíba  
Brasil

Gomes HENRIQUES, Aguida Cristina; CAZAL, Cláudia; LINS, Rafael Claudino; Freire  
Lisboa de CASTRO, Jurema  
Análise Morfológica da Mucosa Oral de Ratos Submetida à Carcinogênese Experimental  
pelo Óxido de Nitroquinolina (4NQO)  
Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 11, núm. 1, enero-marzo,  
2011, pp. 13-20  
Universidade Federal da Paraíba  
Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63719237002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

# Análise Morfológica da Mucosa Oral de Ratos Submetida à Carcinogênese Experimental pelo Óxido de Nitroquinolina (4NQO)

## Morphological Analysis of the Oral Mucosa of Rats Subjected to Experimental Carcinogenesis by Administration of Nitroquinoline Oxide (4NQO)

Aguida Cristina Gomes HENRIQUES<sup>1</sup>, Cláudia CAZAL<sup>2</sup>, Rafael Claudino LINS<sup>3</sup>, Jurema Freire Lisboa de CASTRO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Odontologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

<sup>2</sup>Professora Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

<sup>4</sup>Professora Associado da Disciplina de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

### RESUMO

**Objetivo:** Induzir a carcinogênese na mucosa lingual de ratos Wistar através do óxido de nitroquinolina (4NQO), relacionando as alterações clínicas e microscópicas desenvolvidas com o tempo de exposição ao carcinógeno.

**Método:** Foram utilizados 20 ratos que foram distribuídos entre o grupo experimental (15 animais) e controle (5 animais). No grupo experimental os animais foram alocados em 3 subgrupos, nos quais 5 animais receberam o 4NQO por 2 meses (A1), 5 por 3 meses (A2) e o restante por 4 meses (A3), o que tornou possível a detecção das diferentes fases da carcinogênese. Os dados foram apresentados por meio da estatística descritiva e foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13 e a margem de erro utilizada foi de 5,0%.

**Resultados:** Tanto o modelo animal escolhido, como o carcinógeno químico utilizado foram satisfatórios para produção da carcinogênese oral similar a que ocorre em humanos. As alterações clínicas foram mais acentuadas nos animais que receberam as aplicações tópicas do 4NQO durante 4 meses, sendo possível visualizar desde uma leucoplasia a regiões eritroleucoplásicas. As alterações histopatológicas observadas no epitélio oral foram compatíveis com o diagnóstico de displasia epitelial leve, moderada, severa, carcinoma in situ ou carcinoma invasivo.

**Conclusão:** A severidade das lesões teve relação direta com o tempo de exposição ao 4NQO.

### ABSTRACT

**Objective:** To induce carcinogenesis on the lingual mucosa of Wistar rats by the administration of nitroquinoline oxide (4NQO), relating the clinical and microscopic alterations developed during the time of exposure to the carcinogenic agent.

**Methods:** Twenty rats were allocated to either an experimental (15 animals) or a control (5 animals) group. In the experimental group, the animals were divided into 3 subgroups in which 5 animals received 4NQO during 2 months (A1), 5 during 3 months (A2), and 5 during 4 months (A3), making it possible to detect the different phases of carcinogenesis. Data were presented as descriptive statistics using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests in the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software, version 13.0. The significance level was set at 5.0%.

**Results:** Both the animal model and the carcinogenic agent used in the study were satisfactory for inducing similar oral carcinogenesis to the one occurring in humans. The clinical alterations were more accentuated in the animals that received the topical applications of 4NQO during 4 months, ranging from leukoplakia to erythroleukoplakias regions. The histopathological alterations observed in the oral epithelium were compatible with the diagnosis of mild, moderate and severe epithelial dysplasia, in situ carcinoma or invasive carcinoma.

**Conclusion:** The severity of the lesions had a direct relationship with the exposure time to 4NQO.

### DESCRITORES

Ratos wistar; Carcinoma in situ; Carcinoma de células escamosas.

### KEYWORDS

Wistar rats; Carcinoma in situ; Squamous cell carcinoma.

## INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo dinâmico que consiste no desenvolvimento de uma neoplasia maligna, compreendido desde as alterações mais precoces a nível molecular, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo hospedeiro. Tais alterações levam à ativação de oncogenes ou inativação dos genes supressores de tumor que coordenam funções essenciais da célula, como proliferação, diferenciação, morte por apoptose e estabilidade do genoma<sup>1</sup>.

Para o tecido epitelial de revestimento, esse desenvolvimento neoplásico evolui em múltiplas etapas, as quais incluem hiperqueratose, hiperplasia, displasias em diversos graus, carcinoma *in situ* e por fim o surgimento do carcinoma espinocelular<sup>2,3</sup>. As alterações moleculares presentes nessas lesões precisam ser estabelecidas em seqüência, para permitir o diagnóstico precoce, elaboração de novas formas de tratamento e o aperfeiçoamento dos marcadores prognósticos do câncer oral<sup>4</sup>.

Em pacientes, a análise molecular dessas etapas é inviável devido à incapacidade de biópsias de todos os estágios da carcinogênese. Entretanto, modelos animais induzidos a este processo permitem a reprodução isolada de todos os estágios, incluindo tecido normal, os quais são submetidos à análise histomorfológica, genética e bioquímica.

Na tentativa de desenvolver a carcinogênese oral em animais, uma variedade de carcinógenos químicos foi utilizada, entretanto, muitos falharam, pois a incidência na formação da neoplasia maligna foi muito pequena. Dentre eles, o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) que apesar de ainda ser utilizado, está entrando em desuso<sup>5,6</sup>.

Sabe-se que o 4-Nitroquinoline-1-Oxido (4NQO), carcinógeno sintético solúvel em água, é o melhor carcinógeno atualmente disponível para a produção da tumorigênese oral em ratos. Ele induz a formação dos estágios seqüenciais da carcinogênese e estudos evidenciam que suas alterações histológicas e moleculares são similares as que ocorrem em humanos<sup>2</sup>.

Acredita-se que os efeitos carcinogênicos do 4NQO sejam decorrentes da redução enzimática do seu grupo nitro presente num dos seus anéis aromáticos, seguida da formação de um composto intermediário conhecido como 4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido (4HAQO), que é um metabólito carcinogênico implicado na formação de adutos do DNA. Estudos *in vitro* têm mostrado que o 4HAQO induz um forte estresse oxidativo intracelular com a geração de espécies reativas de oxigênio, como os

radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais parecem ser os responsáveis pela formação de adutos em DNA<sup>7</sup>. Somado a isso, tem-se o fato de que o 4HAQO pode também ser metabolizado e acetilado pela seril-RNAt-sintetase para formar um complexo chamado complexo seril-AMPenzima, o qual tem a capacidade de introduzir grupos quinolonas dentro do DNA, potencializando o dano ao material genético. Sabe-se atualmente que o 4HAQO reage preferencialmente com resíduos de guanina do DNA, promovendo a substituição desta por uma pirimidina, num padrão semelhante ao observado pelos raios ultravioletas do sol e por alguns compostos presentes no tabaco<sup>2</sup>.

Aplicações repetidas do 4NQO produzem carcinoma espinocelular na língua de ratos<sup>5</sup>. As mudanças histopatológicas observadas no epitélio lingual durante o processo são hiperplasia, atipia leve, moderada e severa antes da formação do carcinoma invasivo<sup>7</sup>. A fase de iniciação com alterações celulares irreversíveis ocorrem com 4 semanas de tratamento com o 4NQO e nessa fase nenhuma alteração fenotípica é observada<sup>6</sup>.

Uma série de estudos publicados<sup>2,4,8-10</sup> tem fornecido evidências de uma relação bem estabelecida entre características histológicas da displasia epitelial e o tempo de aplicação do carcinógeno. Em um estudo foi mostrado que essa exposição pode ser tão curta como 2 semanas, já em outra investigação foi necessária a aplicação do carcinógeno por 4, 8 e 12 semanas para o surgimento de uma primeira mudança displásica. É importante relatar ainda, a existência de um período de latência entre o surgimento das alterações histológicas e aparência clínica da mucosa oral<sup>10</sup>. A primeira alteração histológica precede as alterações clínicas em torno de 8 semanas<sup>9</sup>.

A proposta do presente estudo foi induzir a carcinogênese oral em ratos Wistar e avaliar o epitélio de revestimento da mucosa submetida ao tratamento a fim de relacionar as alterações clínicas e histológicas desenvolvidas, com o tempo de exposição ao 4NQO.

## METODOLOGIA

Todo protocolo experimental desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Processo nº 014232/2007-41) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, adultos jovens, machos, pesando aproximadamente 200g<sup>11</sup> provenientes do Biotério de Nutrição da UFPE e mantidos em experimentação no biotério do Laboratório

de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) em condições de luz, temperatura e alimentação padrões.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (A1, A2, A3) e 1 controle (B) de 5 ratos cada um. Os grupos experimentais receberam a aplicação do 4NQO (Sigma, USA) diluído a 0,5% em propilenoglicol, com auxílio de um pincel, na borda lateral esquerda da língua, quatro vezes por semana durante 2, 3 e 4 meses respectivamente. Esta metodologia foi adaptada de outros estudos realizados previamente<sup>8,12,13</sup>. O frasco contendo a solução foi envolvido por papel alumínio para evitar a exposição do 4NQO à luz e mantido a 4°C. Após cada aplicação os animais foram privados de água por 5 horas, para permitir maior tempo de contato do carcinógeno químico com a mucosa oral<sup>14</sup>.

Após os intervalos de tempo propostos, os ratos foram eutanasiados através da administração de dose excessiva de anestésico, pentobarbital sódico (50mg/Kg) por via intraperitoneal. Foram examinadas sob iluminação natural e fluorescente as seguintes regiões: dorso e ventre da língua, assoalho bucal, mucosa jugal e palatal. Os dados foram anotados em ficha padronizada.

Posteriormente, a língua foi removida, fixada em formol a 10% e dividida em secções equivalentes: terços anterior, médio e posterior. Cada secção foi novamente dividida no sentido transversal em dois fragmentos, a fim

de possibilitar a avaliação individual de cada terço. Os espécimes foram emblocados em parafina e em seguida, os blocos foram seccionados em cortes de 5 mµ para obtenção das amostras que seguiram para coloração de rotina em Hematoxilina-Eosina (HE) e montadas com lamínula e Entellan®.

O estudo microscópico das amostras foi realizado em um microscópio de luz Olympus BX 41 nos aumentos de 40, 100 e 400, por dois examinadores independentes, os quais não tiveram conhecimento da classificação das amostras por grupos. O diagnóstico histopatológico para cada terço examinado, foi definido de acordo com os 7 escores (Quadro 1), que classifica o epitélio em normal a carcinoma invasivo<sup>15</sup>. Cada terço foi diagnosticado de acordo com a alteração mais severa que predominou no epitélio.

Com a finalidade de verificar se houve uma relação do grau de severidade das alterações histológicas com o tempo de exposição ao 4NQO, foram obtidas as estatísticas: média e desvio padrão dos escores atribuídos para cada grupo (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. O programa utilizado foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13 e a margem de erro utilizada foi de 5,0%.

**Quadro 1. Escore das alterações histopatológicas no epitélio oral<sup>14</sup>.**

Escore	Diagnóstico Histopatológico	Características Histomorfológicas
0	Normal	----
1	Hiperplasia e/ou Hiperqueratose	Acantose da camada espinhosa e /ou hiperplasia das células da camada basal e parabasal, aumento da espessura da camada de queratina. Ausência de atipia celular.
2	Displasia Leve	Alterações confinadas ao terço basal do epitélio incluindo: hiperplasia das células basais, pleomorfismo e hipercromatismo nuclear, aumento do número de figuras de mitose da camada basal e parabasal.
3	Displasia Moderada	Alterações displásicas nos dois terços basais do epitélio, formação de pontes entre as papilas epiteliais devido à hiperplasia de células basais, queratinização individual das células.
4	Displasia Severa	Alterações displásicas como na displasia moderada, estendendo-se para o terço superior do epitélio.
5	Carcinoma in situ	Mudanças displásicas do epitélio de revestimento em toda espessura.
6	Carcinoma Invasivo	Ilhas de células epiteliais neoplásicas no tecido conjuntivo.

## RESULTADOS

### Aspectos Clínicos e Macroscópicos

Nos animais pertencentes ao grupo A1 não foi observada nenhuma alteração clínica significante. No grupo A2 foi verificada área leucoplásica no terço posterior da língua. As alterações clínicas foram mais acentuadas nos animais que receberam as aplicações

tópicas do 4NQO durante 4 meses (Grupo A3). Neste grupo foi detectado na língua, desde uma leucoplasia na superfície dorsal do terço posterior, sendo esta na maioria dos casos multifocal (Figura 1a), a regiões eritroleucoplásicas de forma e superfície irregulares na superfície dorsal do terço anterior em todos os animais analisados (Figura 1b).

Nas demais regiões observadas, nenhuma alteração patológica foi visualizada macroscopicamente.

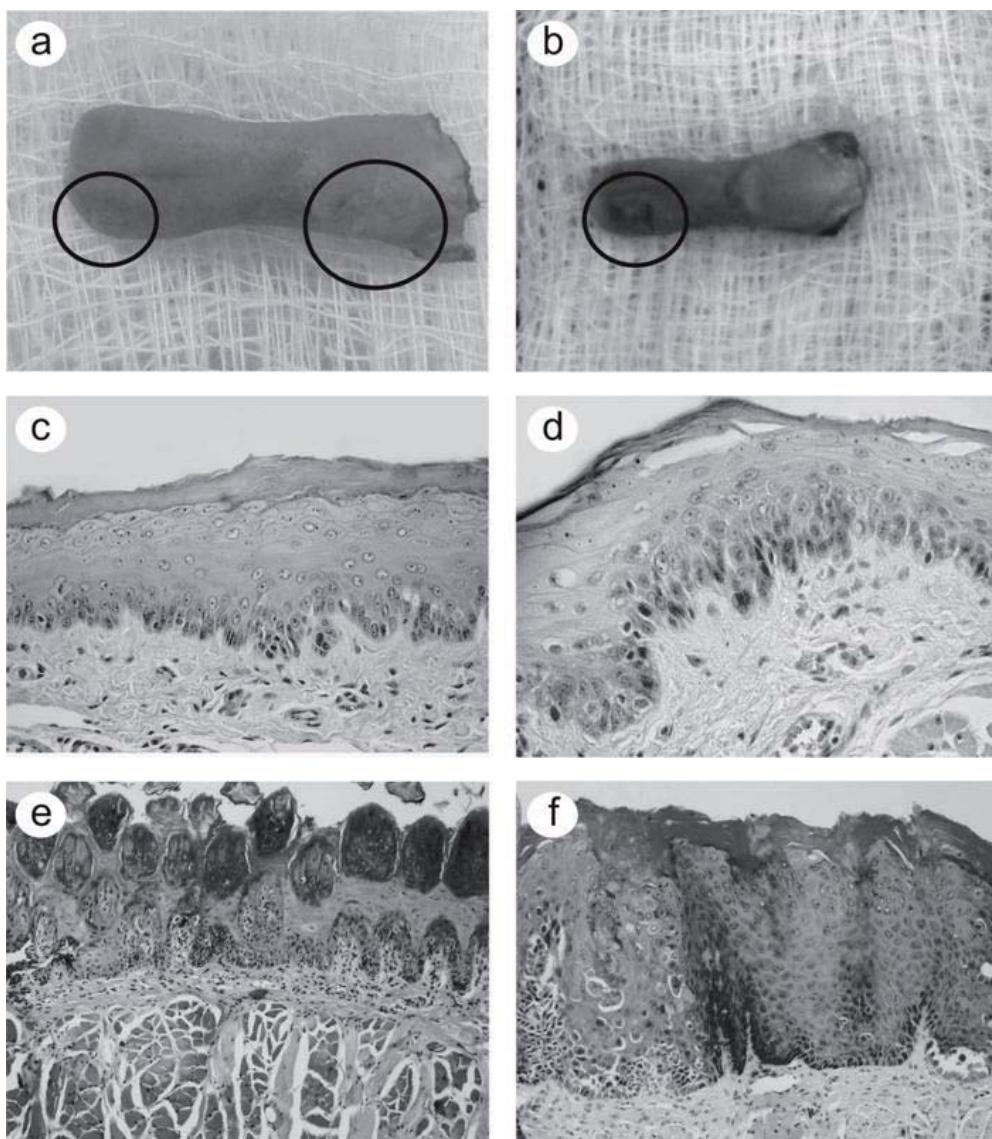


Figura 1. a) Lesão leucoplásica multifocal localizada em terço anterior e posterior da língua de animal do grupo A3. b) Lesão eritroleucoplásia no terço anterior da língua de animal do grupo A3. c) Displasia leve em região de ventre de língua em animal do grupo A3 (H.E.- 400X). d) Displasia moderada em região de ventre de língua em animal do grupo A3 (H.E.- 400X). e) Displasia severa em região de dorso de língua em animal do grupo A3 (H.E.- 200X). f) Carcinoma in situ em região de dorso de língua em animal do grupo A3 (H.E.- 400X).

#### Análise Histopatológica

Os escores para as alterações histopatológicas do epitélio oral atribuídos aos grupos experimentais A1, A2 e A3 estão apresentados na Figura 3.

A maioria das displasias leves foi encontrada no grupo que recebeu carcinógeno por 2 meses (Grupo A1); enquanto que as displasias severas foram marcantes nos grupos que receberam carcinógeno por 3 e 4 meses (Grupo A2 e A3 respectivamente). A moderada ficou igualmente distribuída entre os 3 grupos (Figura 3). É relevante destacar que através da indução carcinogênica instituída nesse estudo desenvolveram-se 2 carcinomas in situ, um com 3 meses de aplicação do carcinógeno e o outro com 4 meses, e 1 carcinoma superficialmente invasivo no grupo A3.

As características histopatológicas padrões

visualizadas nas diversas alterações epiteliais encontradas, estão apresentadas na Figura 1c, onde se observa imagem de epitélio com displasia leve em região de ventre de língua (animal do grupo A3) onde se verifica hiperqueratose, duplicação da camada basal, hiperchromatismo, pleomorfismo nuclear, perda de estratificação em 1/3 do epitélio, aumento do número de mitoses e projeções epiteliais “em gota”. Na Figura 1d observa-se displasia moderada em epitélio de ventre de língua (animal do grupo A3) exibindo além das características já citadas acima, mitoses atípicas e perda de estratificação em 2/3 do epitélio. Um quadro de displasia epitelial severa em dorso de língua (animal do grupo A3) pode ser visualizado na Figura 1e. Verifica-se perda de estratificação e diferenciação celular estendendo-se ao terço superior do epitélio. Na Figura 1f,

carcinoma in situ em epitélio de dorso de língua (animal do grupo A3) onde se visualiza perda de estratificação em toda espessura do epitélio, aumento do número de mitoses, acantólise, diseratose e pleomorfismo nuclear. Alterações celulares em toda espessura do epitélio e invasão de células neoplásicas na região de lâmina própria, podem ser observadas na Figura 2a, que ilustra um carcinoma superficialmente invasivo.

Além das características displásicas encontradas,

outros achados morfológicos se destacaram. Foi visualizado infiltrado inflamatório crônico em todas as amostras teciduais analisadas, que variou de leve a moderado, proporcionando em alguns casos reação liquenóide (Figura 2b) e aumento do número de células de aspecto claro (Figura 2c). A Tabela 1 mostra a freqüência de infiltrado inflamatório e reação liquenóide. O tecido conjuntivo adjacente em alguns casos mostrou edema, vasos congestos e ectásicos.

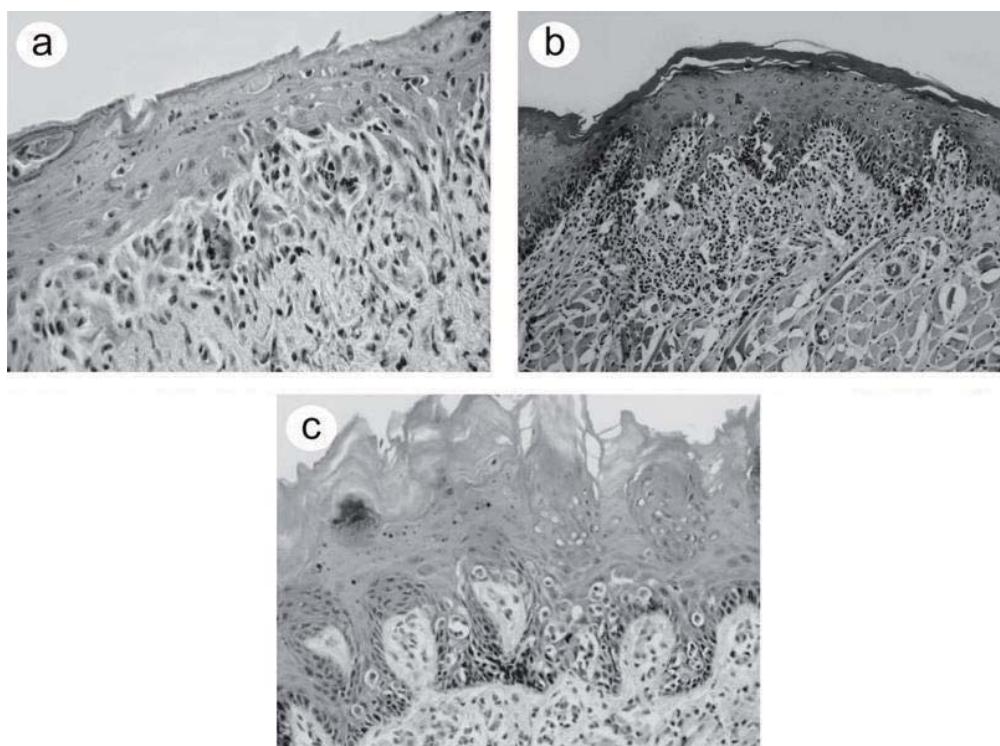


Figura 2. a) Carcinoma superficialmente invasivo em região de ventre de língua em animal do grupo A3 (H.E.- 400X). b) Displasia leve exibindo intenso infiltrado inflamatório crônico em aspecto de reação liquenóide (animal do grupo A3) (H.E.- 200X). c) Aumento do número de células de aspecto claro da camada basal e parabasal (animal do grupo A1) (H.E.- 400X).

**Tabela 1.** Freqüência de infiltrado inflamatório e reação liquenóide entre os grupos experimentais.

Grupo	Infiltrado Inflamatório	Reação Liquenóide
A1	100%	40%
A2	100%	60%
A3	100%	60%

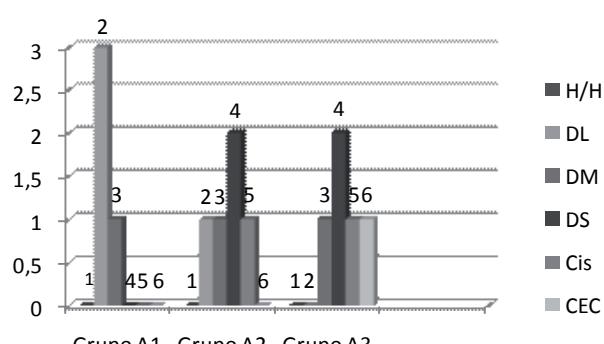


Figura 3. Distribuição dos graus de displasia epitelial entre os grupos experimentais.

A Tabela 2 apresenta a média e desvio padrão dos escores atribuídos para cada grupo, além dos valores de *p* obtidos após comparação do grupo experimental e controle de acordo com o tempo de avaliação.

As médias do grupo A aumentaram com o tempo de avaliação, diferenças estas que se revelaram significantes ( $p<0,05$ ) e através das comparações pareadas do teste de Mann-Whitney comprovou-se diferença significante entre cada um dos tempos conforme indicam as letras minúsculas entre parênteses (Tabela 2). Quando se comparou o grupo A ao seu controle (Grupo B), diferenças significantes foram registradas para cada tempo de avaliação ( $p<0,05$ ).

Ao analisar em conjunto, os resultados deste trabalho pode-se dizer que quanto maior o tempo de aplicação do carcinógeno, maior foi severidade das alterações epiteliais desenvolvidas.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos escores da lesão por grupo e tempo de avaliação.

Grupo	Tempo de Avaliação			Valor de p
	2 meses	3 meses	4 meses	
A	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	$p(1) = 0,019^*$
B	$1,80 \pm 1,10$ (a)	$3,60 \pm 1,14$ (b)	$4,40 \pm 1,14$ (c)	$p(1) = 1,000$
Valor de $p_1$ (2)	$p(2) = 0,017^*$	$p(2) = 0,005^*$	$p(2) = 0,005^*$	

DP: desvio padrão; (\*): diferença significante a 5,0%; (1): Através do teste de Kruskal-Wallis; (2): Através do teste Mann-Whitney;  $p_1$  = Valor do teste entre os grupos B e A para cada tempo de avaliação.

## DISCUSSÃO

Através do modelo de indução carcinogênica utilizado neste estudo, foi possível desenvolver alterações epiteliais referentes a todas as fases da carcinogênese: hiperplasia/ hiperqueratose, displasias leve, moderada e severa, carcinoma *in situ* e carcinoma superficialmente invasivo. Isso só reforça ainda mais que o 4NQO é um excelente carcinógeno utilizado na investigação das alterações histológicas e moleculares em lesões potencialmente malignas e malignas da mucosa oral<sup>11</sup>. Ao contrário do DMBA, que provoca irritação local significativa, causando muitas vezes resposta inflamatória e necrose, dificultando a distinção do que são alterações epiteliais decorrentes de transformação neoplásica verdadeira de uma reatividade celular de origem inflamatória<sup>5,6</sup>. Além disso, os tumores causados pelo DMBA exibem muitas diferenças nas características histológicas em relação ao carcinoma espinocelular em humanos.

A suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral induzido pelo 4NQO é muito variável entre as espécies de roedores e em geral, os ratos são mais suscetíveis que os hamsters. A maior objeção do hamster, é que o tecido intraoral é histologicamente diferente da mucosa oral humana, enquanto o epitélio oral dos ratos consiste em escamoso estratificado, apresentando uma camada de células basais, de células espinhosas e de células granulares, as quais são comparáveis a estrutura epitelial humana<sup>5,16</sup>, como constatou-se nesse estudo.

Com relação às alterações clínicas desenvolvidas na mucosa lingual, foi possível observar apenas lesões leucoplásicas e eritroleucoplásicas. Corroborando com outros autores<sup>6</sup> nem todas as lesões produzidas pelo 4NQO microscopicamente foram visíveis clinicamente ao final dos 4 meses. O tempo aplicado foi curto para provocar formação tumoral que segundo outros estudos<sup>4,11</sup> seria necessário entre 5 a 7 meses. Mas, mesmo assim, foi possível avaliar os estágios precoces do desenvolvimento do câncer, os quais precedem as alterações clínicas teciduais mais exuberantes<sup>17,18</sup>.

Foi verificado em um experimento prévio<sup>19</sup> um aumento significante da proliferação celular e apoptose em lesões potencialmente malignas e em estágios

tumorais precoces. Sabe-se que a proliferação celular é um componente fundamental da carcinogênese oral. Ela tem papel chave na expansão de clones de células iniciadas, e o excesso de replicação contribui para o desenvolvimento da carcinogênese, devido ao nível aumentado de dano ao DNA<sup>20</sup>.

Quanto aos achados microscópicos obtidos neste experimento, foi possível verificar que as incidências de displasia epitelial e carcinoma são dependentes da duração do tratamento com o carcinógeno. Em concordância com a literatura<sup>4,8,21</sup>, as alterações histológicas mostraram que a severidade das lesões aumentou, quanto maior o tempo de exposição ao 4NQO. Nas amostras que receberam 4 meses de carcinógeno (Grupo A3) foi marcante o desenvolvimento de displasia severa, carcinoma *in situ* e superficialmente invasivo, enquanto no grupo A1 a maioria das alterações epiteliais foi representada por displasia leve.

No geral, observou-se uma tendência à diminuição na percentagem de displasia leve, à medida que transcorriam os períodos de observação, como foi observado também em relatos anteriores<sup>4,6</sup>.

Vale salientar que houve uma predominância de alterações epiteliais mais severas nos terços anterior e posterior da língua, provavelmente por ser o local de aplicação e pelo contato direto quando o animal ingere o carcinógeno respectivamente. Este padrão também foi observado por outros autores<sup>11</sup>.

A associação dos achados clínicos aos histopatológicos em cada grupo é coerente. No grupo experimental, por exemplo, quanto maior o tempo de aplicação do carcinógeno, maior a ocorrência de eritroplasia associada às alterações epiteliais mais severas. Esses eventos não foram observados no grupo controle, o qual mostrou características clínicas e histológicas compatíveis com a normalidade.

Sobre a biologia tumoral, há claras evidências de que as alterações clínicas são precedidas por alterações microscópicas como constatado previamente<sup>10,22</sup>. Além disso, foi confirmado que o processo de carcinogênese ocorre em várias fases; os efeitos da carcinogênese estão diretamente relacionados ao tempo de exposição às substâncias carcinogênicas; e as alterações displásicas são

lesões potencialmente malignas capazes de progredirem a carcinoma.

Adicionalmente, é relevante comentar que as lesões potencialmente malignas e cancerosas induzidas pelo 4NQO em ratos tendem a ser menos invasivas e histologicamente bem diferenciadas quando comparadas àquelas desenvolvidas naturalmente em humanos. É interessante destacar que todas as lesões do grupo experimental estavam associadas a um processo inflamatório crônico, induzido provavelmente pela ação irritante do carcinógeno. Sabe-se que o infiltrado inflamatório pode contribuir com o desenvolvimento da neoplasia, mas é possível que essas células inflamatórias exerçam também um papel protetor contra a malignidade<sup>23</sup>, o que pode explicar o fato dessas lesões induzidas artificialmente serem menos invasivas. Um estudo recente sobre o papel do sistema imunológico em carcinoma de células escamosas de língua e lábio em humanos sugere que as células T funcionam como células efetoras que são responsáveis pela imunidade em longo prazo contra o tumor<sup>23</sup>.

Outro fato, é que em ratos as lesões são geralmente multifocais e confluem, fato observado nesse estudo. Apesar dessas limitações, ele é o melhor modelo apresentado, pois é o que mais se assemelha ao da cavidade oral humana<sup>2</sup>.

Além dos achados de displasia, outros aspectos histopatológicos puderam ser observados durante a realização deste estudo. Dentre esses achados ocasionais, se destacou o aumento de células de aspecto claro que possivelmente representam melanócitos. Sabe-se que o epitélio que recobre as papilas filiformes possui numerosos melanócitos, numa proporção de 1 melanócito para 5 queratinócitos<sup>24</sup>. O fato é que nas amostras induzidas a carcinogênese esta relação está alterada. Haveria assim a necessidade de confirmação imunoistoquímica para os anticorpos S100, HMB45 ou Melan A, para detectar se são melanócitos ou se é uma degeneração hidrópica induzida pelo infiltrado inflamatório. Independente disso sabe-se que esse achado histológico não é normal quando comparado ao grupo controle que possui um número bem inferior de células de aspecto claro. É possível que essas características façam parte das alterações epiteliais displásicas do modelo animal utilizado.

A acantólise das células localizadas nas papilas epiteliais também foi observada em alguns animais dos grupos experimentais, fato esperado para as alterações displásicas, já que as células adquirem uma maior motilidade e tendência à migração.

## CONCLUSÃO

O 4NQO é capaz de produzir todas as fases da carcinogênese em modelo animal e esse processo tem relação direta com o tempo de exposição ao agente carcinógeno. Além disso, o modelo animal utilizado mostrou-se bastante eficiente para reproduzir os estágios iniciais da carcinogênese humana em tempo experimental que facilita os estudos nesta área. É de grande importância um modelo animal experimental que represente exatamente as alterações microscópicas associadas à iniciação e progressão do câncer humano, pois ajuda no entendimento do processo e dessa forma contribui para a elaboração e aperfeiçoamento de novos métodos preventivos e terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

1. Montenegro MR, Franco M. Patologia: Processos gerais. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 320p.
2. Kanojia D, Vaidya MM. 4 – Nitroquinoline – 1- oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 2006; 42(7):655-67.
3. Kujan O, Khattab AA, Oliver RJ, Roberts SA, Thakke RN, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol* 2007; 43(3):224-31.
4. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-Nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncol* 2004; 40(3):287-97.
5. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol* 2006; 42(5):448-60.
6. Tang X, Knudsen B, Bemis D, Thikoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1):301-13.
7. Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-Nitroquinoline 1-oxide induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23(8):1361-7.
8. Kaplan I, Hochstadt T, Dayan D. PCNA en lesiones displásicas de la mucosa de la lengua y del paladar inducidas por aplicación tópica de 4NQO em ratas desalivadas. *Medicina Oral* 2002; 7(5):16-23.
9. Rich AM, Reade PC. Histomorphometric analysis of epithelial changes in chemically induced oral mucosal carcinogenesis in rats. *J Oral Pathol* 1988; 17(9-10):528-33.
10. Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol* 2005; 4(4):337-9.
11. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol* 2007; 43(1):999-1006.
12. Aguiar MCF, Bernardes VF, Cardoso SV, Barbosa AA, Mesquita RA, Carmo MAV. Immunohistochemical evaluation of metallothionein in palatal mucosal cells of mice treated with 4NQO. *Oral Med Pathol* 2006; 33(11):315-8.
13. Rich A.M; Reade PC. Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2001; 30(7):389-97.
14. Navarro CM, Almeida OP, Line SRP. Carcinogênese experimental: Lesões palatinas e linguais produzidas pelo óxido de nitroquinolina (4NQO) em ratos. *Rev Odontol UNESP* 1994;

23(1):71-80.

15. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC, 2005. p. 140-3.
16. Ide F, Oda H, Nakatsuru Y, Kusama K, Sakashita H, Tanaka K, Ishikawa T. Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-Nitroquinoline 1-Oxide induced tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001; 22(4):567-72.
17. Tsantoulis PK. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol* 2007; 43(6):523-34.
18. Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(2):99-106.
19. Derka S, Vairaktaris E, Papakosta V, Vassiliou S, Acil Y, Vylliotis A et al. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncol* 2006; 42(5):540-50.
20. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Annals Oncology* 2004; 15(9):1319-29.
21. Ribeiro DA, Salvadori DMF, Silva RN, Darros BR, Marques MEA. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol* 2004; 40(9):910-15.
22. Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol* 1997; 33(2):105-9.
23. Silveira EJD, Miguel MCC, Lima KC, Freitas RA, Morais MLSA, Queiroz LMG. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Exp Mol Pathol* 2010; 88(1):171-5.
24. Katchburian E, Arana CVE. Histologia e embriologia oral. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 2004.

Recebido/Received: 28-09-09

Revisado/Reviewed: 08/03/10

Aprovado/Approved: 10/05/10

**Correspondência:**

Aguida Cristina Gomes Henriques

Rua Aurélio Domingues, 173 - apto 701 - Torre

Recife/PE CEP: 50710-020

Telefone: (81) 9252-3968

E-mail: aguidacgh@gmail.com