

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CHEYENNE COSCIA BUENO

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E DA IMORTALIZAÇÃO CELULARES NO  
EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
CARCINOGENESE INDUZIDA PELA 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO)

Porto Alegre  
2015

CHEYENNE COSCIA BUENO

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E DA IMORTALIZAÇÃO CELULARES NO  
EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
CARCINOGENESE INDUZIDA PELA 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Coelho Carrard

Porto Alegre  
2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Bueno, Cheyenne Coscia

Avaliação da proliferação e da imortalização celulares no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pela 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) / Cheyenne Coscia

Bueno. -- 2015.

37 f.

Orientador: Vinicius Coelho Carrard.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Carcinogênese. 2. Modelo experimental. 3. Imunomarcção. I. Carrard, Vinicius Coelho, orient. II. Título.

## RESUMO

BUENO, Cheyenne Coscia. **Avaliação da proliferação e da imortalização celulares no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pela 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO)**. 2015. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar proliferação e imortalização celulares no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese bucal induzida pela 4NQO. Foram utilizados 43 ratos Wistar machos distribuídos em dois grupos experimentais: controle (n=10) e 4NQO (n=33). Os animais do grupo controle receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram submetidos à eutanásia após 20 semanas de experimento. Os animais do grupo 4NQO receberam ração padrão e o carcinógeno diluído em água (25 ppm) e foram submetidos à eutanásia após 4 (T4, n=10), 12 (T12, n=10) ou 20 (T20, n=13) semanas de experimento. Posteriormente, as línguas dos animais foram removidas para avaliação clínica e histopatológica da mucosa. Clinicamente, as lesões foram classificadas em mancha/placa, nódulos e úlceras. Houve uma maior incidência de lesões nos animais do grupo T20. Microscopicamente, as amostras foram classificadas em: sem alteração histopatológica, hiperplasia epitelial (com hiperqueratose), displasia epitelial (leve, moderada, severa), carcinoma *in situ* (CIS) e carcinoma espinocelular (CEC). A avaliação da imunomarcagem com BMI-1 foi semiquantitativa a partir da utilização de um sistema de escores (0-30%, 30-50%, 50-80% e >80%). A quantificação da imunomarcagem pelo Ki-67 considerou o número de células positivas para 1000 células epiteliais. Foram encontradas 65 lesões a partir da análise histopatológica, sendo as primeiras percebidas no grupo T4. As imunomarcações pelo Ki-67 e pelo BMI-1 foram progressivamente maiores à medida que as alterações histopatológicas se tornavam mais graves, mas o aumento da imunomarcagem pelo BMI-1 só aumentou significativamente no grupo composto por CIS/CEC. Houve associação entre as imunomarcações por Ki-67 e por BMI-1 (Correlação de Spearman, R=0,33, p=0,03). Os resultados deste estudo indicam que proliferação e imortalização celulares são eventos relacionados e que a proliferação celular aumenta gradualmente e a imortalização celular aumenta no estágio mais avançado da progressão tumoral.

**Palavras-chaves:** Carcinogênese. Proliferação celular. Ratos Wistar.

## ABSTRACT

BUENO, Cheyenne Coscia. **Evaluation of proliferation and cellular immortalization in the lingual epithelium of rats submitted to carcinogenesis model induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)**. 2015. 37 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

The aim of this study was to evaluate cell proliferation and immortalization in the lingual epithelium of rats submitted to the oral carcinogenesis model induced by 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO). 43 Male Wistar rats were distributed into two groups: control (n = 10), 4NQO (n = 33). The animals in the control group received standard chow diet and water *ad libitum* and were euthanized after 20 weeks of experiment. The animals of 4NQO group received standard rat chow diet and the carcinogen diluted in water (25 ppm) and were euthanized after 4 (T4, n=10), 12 (T12, n=10) or 20 (T20, n=13) weeks of the experiment. Subsequently, the tongues of the animals were removed to clinical and histopathological evaluation of the mucosa. Clinically, the lesions were classified into patch/plaque, nodules and ulcers. There was a higher incidence of lesions in animals of Group T20. Microscopically, the samples were classified as no histopathological changes, epithelial hyperplasia (with hyperkeratosis), epithelial dysplasia (mild, moderate, severe), in situ carcinoma (ISC) and squamous cell carcinoma (SCC). The evaluation of immunostained with BMI-1 was taken from the system scores (0-30%, 30-50%, 50-80% and > 80%). The quantification of Ki-67 immunolabeling considered the number of positive cells for 1000 epithelial cells. 65 lesions were found from the histopathological analysis, and firstly noticed in the T4 group. Positivity for Ki-67 and BMI-1 increased progressively over the histopathological changes stages. However the BMI-1 immunolabeling increase was statistically significant only for ISC/SCC stage. There was an association between immunostaining for Ki-67 and BMI-1 (Correlação de Spearman, R=0,33, p=0,03). The results of this study indicate that cell proliferation and immortalization are related events and that gradually increases cell proliferation and cell immortalization increases the more advanced stages of tumor progression.

**Keywords:** Carcinogenesis. Cell proliferation. Wistar rats.

## SUMÁRIO

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>05</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>09</b>
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>10</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE A - Características clínicas da mucosa normal e das diferentes lesões induzidas a partir do modelo 4NQO.....</b>	<b>33</b>
<b>APÊNDICE B - Características histopatológicas observadas a partir do modelo 4NQO.....</b>	<b>34</b>
<b>APÊNDICE C – Imunomarcção por Ki-67 e BMI-1.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais/Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.....</b>	<b>37</b>

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum em boca correspondendo a aproximadamente 94% dos casos (WARNAKULASURIYA, 2009). Apesar dos inúmeros esforços realizados no sentido de estudar comportamento biológico e tratamentos alternativos, a taxa de mortalidade relacionada a esta doença não tem sofrido reduções significativas nas últimas décadas, se mantendo em torno de 50% em 5 anos (BIAZEVIC et al., 2006). Os principais fatores associados à ocorrência do CEC são o consumo de tabaco e de álcool (FRANCO et al., 1989; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; RODRIGUEZ et al., 2004), especialmente de forma combinada (BLOT et al., 1988), sendo observado um efeito multiplicativo (RODRIGUEZ et al., 2004; HASHIBE et al., 2009).

O desenvolvimento do câncer bucal é um processo de múltiplas etapas que se inicia com alterações moleculares, imperceptíveis ao exame clínico visual, evoluindo posteriormente para estágios em que ocorrem as manifestações clínicas da doença (MARTÍNEZ, 2012). Em aproximadamente 50% dos casos, o carcinoma espinocelular é precedido por lesões pré-malignas visualizadas como manchas ou placas brancas chamadas leucoplasias, as quais podem ou não estar associadas a lesões vermelhas (leucoeritroplasia) (VERED et al., 2007). O diagnóstico dessas lesões envolve a realização de biópsia e exame histopatológico, a fim de identificar quais alterações arquiteturais e celulares estão presentes. Do ponto de vista microscópico, podem ser observados distúrbios de maturação epitelial que incluem desde alterações mais brandas como a hiperqueratose e hiperplasia epitelial, alterações mais graves do processo de renovação epitelial denominadas displasias ou até mesmo carcinomas espinocelulares (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Sabe-se que entre 0,13-17,5% dos pacientes com leucoplasia sofrem transformação maligna em períodos de observação que variam de 1 a 30 anos, o que justifica o seu acompanhamento clínico periódico (EINHORN; WERSALL, 1967; SILVERMAN et al., 1976). Contudo, não estão definidos fatores capazes de prever em quais pacientes este evento vai ocorrer (RIBEIRO et al., 2004).

A alta taxa de mortalidade associada ao câncer de boca se deve, em parte, a sua detecção tardia em estágios em que já houve disseminação à distância (GOURIN; JOHNSON, 2001; LING; MIJITI; MOMING, 2013). Este fato poderia ser atenuado a partir da identificação de biomarcadores que tivessem a capacidade de

predizer transformação maligna ou de uma maior compreensão dos estágios iniciais da progressão tumoral (KANOJIA; VAIDYA, 2006). Neste sentido, modelos de carcinogênese induzida experimentalmente em animais têm sido utilizados a fim de aprofundar o entendimento a respeito dos diferentes eventos envolvidos neste processo. A utilização desses modelos é de fundamental importância para identificar as alterações moleculares e celulares presentes nas diferentes etapas da carcinogênese bucal e facilitar o estabelecimento de abordagens terapêuticas alternativas (MOGNETTI; DI CARLO; BERTA, 2006).

Dentre os modelos de indução de CEC em roedores, o do 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) em ratos é um dos métodos mais difundidos. O 4NQO é um carcinógeno sintético solúvel na água de abastecimento capaz de induzir tumores na cavidade bucal, principalmente na língua (KANOJIA; VAIDYA, 2006). Além da boca, o esôfago pode ser afetado por tumores, mas outras porções do trato digestivo não costumam apresentar lesões (TANG et al., 2004). Dois métodos podem ser utilizados: aplicação tópica ou dissolução da substância na água a que os animais têm acesso (DAYAN et al., 1997; RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2005; RIBEIRO et al., 2007; MINICUCCI et al., 2009; EL-ROUBY, 2011). Esta substância provoca alterações celulares e teciduais que mimetizam aquelas descritas na carcinogênese bucal em humanos (VERED et al., 2003), a partir da indução de etapas seqüenciais como hiperplasia, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa e carcinoma in situ e CEC invasivo (WILKEY et al., 2009).

O mecanismo de ação do 4NQO envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem induzir danos a macromoléculas, como o DNA, levando à ocorrência de tumores a partir do fenômeno chamado estresse oxidativo (NUNOSHIBA; DEMPLE, 1993). Estes danos são semelhantes àqueles causados por substâncias presentes no tabaco (MARTINEZ, 2012). Alguns estudos sugerem que o dano oxidativo ao DNA parece ser um evento precoce durante o processo de carcinogênese induzida por 4NQO em língua de ratos (RIBEIRO et al., 2004; MIRANDA et al., 2011).

A expressão de diversas proteínas sabidamente alteradas na carcinogênese bucal em humanos foi analisada por meio deste modelo de carcinogênese induzida experimentalmente em animais. Vários estudos investigaram a influência de diferentes biomarcadores associados à maturação epitelial, ao ciclo celular, à apoptose e às interações célula-célula. A partir destes, observou-se que alterações



na expressão e na atividade de proteínas como a ciclina D1 e cdk4 (KOONTONGKAEW et al., 2000), p16INK4A (NAKAHARA et al., 2004), E-caderina e P-caderina (SAKAKI et al., 2003), citoqueratinas - CK1 e CK14 (TANG et al., 2004) precedem alterações histológicas típicas das etapas iniciais da carcinogênese induzida por 4NQO que correspondem aos estágios subclínicos da doença (KANOJIA; VAIDYA, 2006).

Neste mesmo estágio da progressão tumoral, Nishimura et al. (1999) e Ribeiro, Salvadori e Marques (2005) encontraram superexpressão dos genes Bcl-2 e Bax, os quais participam da regulação da apoptose e da sobrevivência celular. Utilizando-se deste mesmo modelo, Ribeiro et al. (2007) demonstraram expressão aumentada da proteína inibidora da apoptose survivina, após 4 semanas de tratamento com 4NQO, mesmo na ausência de lesões clinicamente detectáveis (RIBEIRO et al., 2007). Por outro lado, em estudo recente de Minicucci et al. (2011) observou-se progressivo aumento de expressão da proteína pró-apoptótica p53 em hiperplasias e displasias epiteliais induzidas na mucosa bucal de ratos a partir da utilização deste modelo experimental, mas esta não mostrou associação com mutação no gene Tp53.

Dentre as alterações complexas que levam a transformação maligna, a imortalização parece ser um evento crucial. A BMI-1 é uma proteína necessária para a manutenção da autorrenovação celular (PARK; MORRISON; CLARKE, 2004; WANG et al., 2010) que atua na indução da atividade da telomerase e na imortalização das células epiteliais humanas (SONG et al., 2006). Acredita-se que esta proteína seja um dos marcadores de célula-tronco essenciais para a manutenção das propriedades de auto-renovação da tumorigenicidade do câncer de cabeça e pescoço (PRINCE et al., 2007; HUANG et al., 2009). Nesta situação, há aumento da expressão da BMI-1 gerando desregulação da proliferação e imortalização das células epiteliais, levando a um pior prognóstico (HAYRY et al., 2010). Contudo, existem poucas informações a respeito da imunoexpressão desta proteína nos estágios iniciais da carcinogênese experimental.

Sabe-se que o progressivo aumento da proliferação celular é um dos principais eventos durante a progressão tumoral, contribuindo tanto na ocorrência de erros na replicação e no acúmulo de mutações, quanto na invasão dos tecidos vizinhos (TOMATIS, 1993; MACLUSKEY et al., 1999). Além disso, alguns estudos demonstraram que o aumento gradual da atividade proliferativa do tecido epitelial é

importante já nos estágios que antecedem a invasão do tecido conjuntivo (HUANG et al., 1994; WARNAKULASURIYA; MACDONALD, 1995; LAN et al., 1996). O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histônica expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (GERDES et al., 1983) que vem sendo amplamente utilizada como marcador de proliferação celular em casos de diferentes distúrbios de maturação epitelial e carcinomas espinocelulares. Estudos têm demonstrado que o aumento da sua expressão na camada suprabasal do epitélio mostrou relação direta com a severidade da displasia epitelial em leucoplasias (GONZALEZ-MOLES et al., 2000).

Diante do que foi exposto, constata-se que não está claro como as alterações no controle da atividade proliferativa e dos mecanismos relacionados a imortalização se relacionam durante as diferentes etapas da progressão tumoral, sendo importante a realização de mais estudos para aprofundar o entendimento desses eventos.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar proliferação e imortalização celulares em epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pelo 4NQO.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

**Avaliação da proliferação e da imortalização celulares no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pela 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO).**

Cheyenne Coscia Bueno<sup>a</sup>, Isadora Peres Klein<sup>a</sup>, Michael Everton Andrades<sup>b</sup>, Luise Meurer<sup>c</sup>, Manoela Domingues Martins<sup>a</sup>, Vinicius Coelho Carrard<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>b</sup> Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>c</sup> Unidade de Patologia Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\*Autor correspondente:

Vinicius Coelho Carrard

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Tel.: +55-51-3308.5011, Fax: +55-51-3308.5023

E-mail: [vinicius.carrard@telessauders.ufrgs.br](mailto:vinicius.carrard@telessauders.ufrgs.br)

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar proliferação celular e ocorrência de imortalização celular no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese bucal induzida pela 4NQO. Foram utilizados 43 ratos Wistar machos distribuídos em grupos experimentais: controle (n=10), 4NQO (n=33). Os animais do grupo controle receberam ração padrão e água *ad libitum* e foram submetidos à eutanásia após 20 semanas de experimento. Os animais do grupo 4NQO receberam o carcinógeno diluído em água (25 ppm) e ração padrão e foram submetidos à eutanásia após 4 (n=10), 12 (n=10) ou 20 (n=13) semanas de experimento. Clinicamente, as lesões foram classificadas em mancha/placa, nódulos e úlceras. Houve uma maior incidência de lesões nos animais do grupo T20. Foram encontradas 65 lesões a partir da análise histopatológica, sendo as primeiras percebidas no grupo T4. A proliferação celular aumentou progressivamente ao longo dos estágios de alterações histopatológicas. A imunomarcagem por BMI-1 aumentou progressivamente à medida que as alterações histopatológicas se tornavam mais graves e estatisticamente maiores no estágio carcinoma *in situ*/carcinoma espinocelular. Houve correlação entre as imunomarcagens por Ki-67 e por BMI-1 (Correlação de Spearman,  $R=0,33$ ,  $p=0,03$ ). Os resultados deste estudo indicam que proliferação e imortalização celulares são eventos relacionados e que a proliferação celular aumenta gradualmente e a imortalização celular aumenta no estágio mais avançado da progressão tumoral.

**Palavras-chave:** Carcinogênese. Modelo experimental. Imortalização celular.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum em boca correspondendo a aproximadamente 94% dos casos (Warnakulasuriya, 2009), apresentando crescimento rápido e invasivo (van der Waal, 2013). Dentre fatores de risco extrínsecos e intrínsecos, o consumo de tabaco e de álcool são os principais fatores associados à ocorrência do CEC (Franco et al., 1989; Llewellyn, Johnson e Warnakulasuriya, 2004; Rodriguez et al., 2004), especialmente de forma combinada (Blot et al., 1988).

A alta taxa de mortalidade associada ao câncer de boca se deve, em parte, a sua detecção tardia em estágios em que já houve disseminação à distância (Gourin e Johnson, 2001; Ling, Mijiti e Moming, 2013). Este fato poderia ser atenuado a partir da identificação de biomarcadores que tivessem a capacidade de prever transformação maligna ou de uma maior compreensão dos estágios iniciais da progressão tumoral.

Estudos com modelo experimental em roedores permitem aprofundar o entendimento dos distúrbios envolvidos na carcinogênese bucal desde os estágios subclínicos até a sua manifestação clínica, permitindo uma melhor compreensão das alterações moleculares e celulares que ocorrem durante a progressão tumoral e para desenvolver formas alternativas de tratamento. Alguns modelos de carcinogênese bucal induzida utilizam substâncias análogas aos carcinógenos presentes no tabaco. Dentre eles, o 4NQO é um dos mais utilizados em ratos, pois pode ser diluído na água de abastecimento, tornando fácil a sua administração (Umemura et al., 2008; Hong et al., 2009; Minicucci et al., 2009; Ribeiro et al., 2009; Fracalossi et al., 2010; Naoi et al., 2010; Vered et al., 2010; Fracalossi et al., 2011; Minicucci et al., 2011; Miranda et al., 2011; Moon et al., 2012). Além disso, este modelo induz lesões preferencialmente na língua, um dos sítios preferenciais para a ocorrência CEC em humanos (Martinez, 2012).

Dentre as alterações complexas que ocorrem durante a progressão tumoral, proliferação e imortalização celulares parecem ser eventos cruciais. A BMI-1 é uma proteína necessária para a manutenção da autorrenovação celular (Park, Morrison e Clarke, 2004; Wang et al., 2010) que atua na indução da atividade da telomerase e na imortalização das células epiteliais humanas (Song et al., 2006). Acredita-se que esta proteína seja um dos marcadores de célula-tronco essenciais para a

manutenção das propriedades de auto-renovação da tumorigenicidade do câncer de cabeça e pescoço (Prince et al., 2007; Huang et al., 2009). Nesta situação, há aumento da expressão da BMI-1 gerando desregulação da proliferação e imortalização das células epiteliais, levando a um pior prognóstico (Hayry et al., 2010). Contudo, existem poucas informações a respeito da imunoexpressão desta proteína nos estágios iniciais da carcinogênese experimental.

Sabe-se que o progressivo aumento da proliferação celular é um dos principais eventos durante a progressão tumoral, contribuindo tanto na ocorrência de erros na replicação e no acúmulo de mutações, quanto favorecendo a invasão dos tecidos vizinhos (Tomatis, 1993; Macluskey et al., 1999). Além disso, alguns estudos demonstraram que o aumento gradual da atividade proliferativa do tecido epitelial é importante já nos estágios que antecedem a invasão do tecido conjuntivo (Huang et al., 1994; Warnakulasuriya e Macdonald, 1995; Lan et al., 1996). O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histônica expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (Gerdes et al., 1983) que vem sendo amplamente utilizada como marcador de proliferação celular em displasia epitelial bucal e câncer bucal. Estudos têm demonstrado que o aumento da sua expressão na camada suprabasal do epitélio mostrou relação direta com a severidade da displasia epitelial em leucoplasias (Gonzalez-Moles et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar como proliferação e imortalização celulares se modificam no epitélio lingual de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pela ingestão do 4NQO desde o estágio subclínico da doença até o surgimento do carcinoma espinocelular.

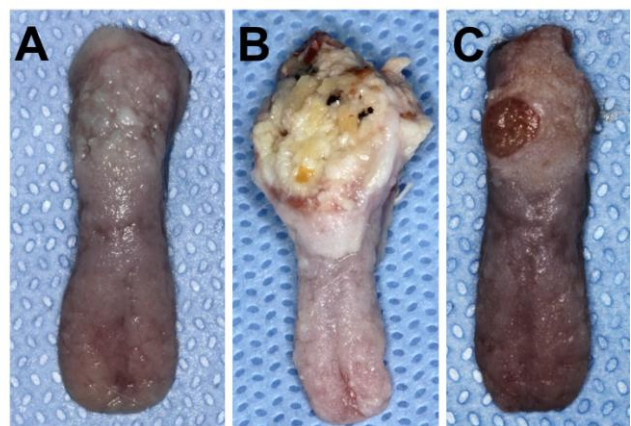
## MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta e três ratos Wistar machos (dois meses de idade) pesando aproximadamente 300g foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Pelotas/Brasil. Os animais foram pesados, randomizados e agrupados em quatro grupos. O grupo controle (n=10) recebeu ração balanceada padrão para roedores e água *ad libitum*. Os grupos experimentais receberam ração balanceada e solução de 4NQO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída na água de beber com concentração final de 25 ppm durante 4 semanas (T4, n=10), 12 semanas (T12, n=10) ou 20 semanas (T20, n=13). A solução era acondicionada em mamadeiras de vidro pintadas, para evitar degradação do 4NQO pela luz. Os animais permaneceram em ambiente climatizado ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa entre 50% e 60% e ventilação adequada com ciclo claro/escuro de 12 horas. O peso dos animais e os consumos de ração, água e de solução de 4NQO foram monitorados semanalmente e o estado de saúde geral, diariamente. Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral com isoflurano (5% em 0,5 L/min de  $\text{O}_2$ ). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética local de pesquisa no uso de animais (protocolo nº. 140049).

### Análise clínica

No momento da eutanásia, as línguas removidas cirurgicamente foram submetidas a uma avaliação macroscópica, sendo a presença de lesões registrada. Estas foram classificadas como mancha/placa, nódulo ou úlcera (Figura 1: A, B e C, respectivamente).

**Figura 1.** Apresentações clínicas das diferentes lesões encontradas (A: Mancha/Placa, B: Nódulo, C: Úlcera).





### Análise histopatológica

Após análise clínica, as línguas foram imersas em solução de formalina a 10% tamponada para fixação e posterior processamento para emblocamento em parafina. Cortes histológicos de 3µm foram obtidos dos blocos de parafina e submetidos à técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE). A partir da análise histopatológica, os espécimes foram classificados em: sem alterações, hiperplasia epitelial com hiperkeratose, displasia epitelial (leve, moderada e severa), carcinoma *in situ*, e carcinoma espinocelular (Warnakulasuriya, 2008). A frequência de cada tipo de lesão foi registrada para cada grupo. No grupo controle, a mucosa do dorso da língua foi utilizada como referência para análise histopatológica.

### Imunohistoquímica

Cortes histológicos de 4µm, em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em estufa a 60°C por 12 horas, seguidas por banhos em xilol e hidratação em álcool. As lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, o corte foi submetido à recuperação antigênica e então incubado com os anticorpos primários anti-Ki-67 (1:50, MIB-1, DAKO) e anti-BMI1 (1:100, Ab14389, Abcam). Como controle positivo para reações imunohistoquímicas do Ki-67 e BMI-1 foram utilizados, respectivamente, Hiperplasia Linfóide Folicular e Carcinoma espinocelular.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de Hidrogênio a 5%, seguida do bloqueio das reações inespecíficas com a utilização de leite em pó. O anticorpo secundário e a streptavidina fazem parte do kit LSAB (Dako) que foi utilizado, e a revelação foi feita com o kit DAB (DAB, DakoCytomation, USA), que contém 0,03% de 3-31-diaminobenzidina, e foram contra-coradas com solução de hematoxilina de Harris. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por albumina sérica bovina (BSA) a 1% diluída em tampão TRIS-HCl, pH 7,4. Apenas células coradas em marrom, independentemente de sua intensidade, foram consideradas como positivas.

Para cada lâmina imunomarcada para o Ki-67 foi registrado o número de células positivas para cada 1000 células epiteliais, compreendendo a aproximadamente 5 campos microscópicos de 400x de magnificação (Fracalossi et al., 2011).

A avaliação da imunomarcção com BMI-1 utilizou o sistema de escores de positividade (Buduneli et al., 2007): muito baixa (0-30%), baixa (30-50%), moderada (50-80%) e alta (>80%).

#### Análise estatística

A distribuição dos dados relacionados às diferentes variáveis foi testada a partir da aplicação dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Peso inicial (g), peso final (g) dos animais, peso de ração (g) e volume de soluções consumidas (ml) por gaiola apresentaram distribuição normal. Dessa forma, a comparação entre os grupos foi realizada a partir do teste de Análise da variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (*post-hoc*) de Tukey. Ganho de peso (%) mostrou distribuição não-normal dos dados, sendo os dados dos grupos comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados da quantificação da imunomarcção pelo Ki-67 foram comparados com o auxílio do teste de ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Tukey. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparação dos escores para imunomarcção de BMI-1 entre os grupos.

A relação entre imunomarcção pelo Ki-67 e pelo BMI-1 foi avaliada de duas formas. Primeiramente, os diferentes escores de imunomarcção para o BMI-1 foram considerados como fator de agrupamento (variável independente) e os valores para Ki-67 foram comparados pelo teste de ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Além disso, a correlação entre as variáveis foi testada pelo teste de correlação de Spearman. As análises foram realizadas no programa PASW 18.0 e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

## RESULTADOS

Do total de 43 ratos, um animal do grupo experimental T20 morreu antes de completar o estudo (17ª semana). A variação de peso corporal e o consumo de ração e solução ao longo do experimento estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Na análise da variação de ganho de peso (%) ao longo do experimento, observou-se que houve um menor ganho nos grupos T4 e T20. No grupo T4, também houve menor consumo de ração. Em relação ao consumo de solução, os grupos que receberam carcinógeno apresentam tendência ( $p=0.05$ ) a um menor consumo de solução em comparação ao grupo controle.

**Tabela 1.** Peso inicial (g), final (g) e ganho de peso (%) nos diferentes grupos.

Grupo	Peso inicial (g)*		Peso final (g)*		Ganho de peso (%)#	
	Média (DP)	p	Média (DP)	p	Média (DP)	p
<b>Controle</b>	362,42 (31,96)	0,85	511,63 (43,43) a	<0,01	41,32 (5,15) a	<0,01
<b>T4</b>	364,56 (33,23)		376,40 (47,10) b		3,03 (6,03) b	
<b>T12</b>	364,07 (35,97)		454,19 (50,87) ac		24,68 (4,91) c	
<b>T20</b>	373,65 (35,52)		416,67 (75,49) bc		11,15 (15,40) b	

\* ANOVA/Tukey. # Kruskal Wallis/Dunn. Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si.

**Tabela 2.** Consumo de ração e solução por grupo experimental.

Grupo	Ração		Solução	
	Média (DP)	p	Média (DP)	P
<b>Controle</b>	24,17 (1,41) a	<0,01	32,65 (3,41)	0,05
<b>T4</b>	14,69 (2,68) b		21,95 (2,82)	
<b>T12</b>	22,17 (1,98) a		22,63 (2,20)	
<b>T20</b>	22,63 (1,61) a		27,26 (6,47)	

ANOVA/Tukey. Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si.

A tabela 3 apresenta o número de lesões clínicas e alterações histopatológicas em cada grupo experimental. Nos grupos T4 e T12 as lesões clínicas foram mais discretas e não houve mais que uma lesão clínica por sítio anatômico (dorso e ventre de língua). Nestes grupos realizou-se uma avaliação para dorso e outra para ventre de língua de cada animal. Em alguns animais do grupo

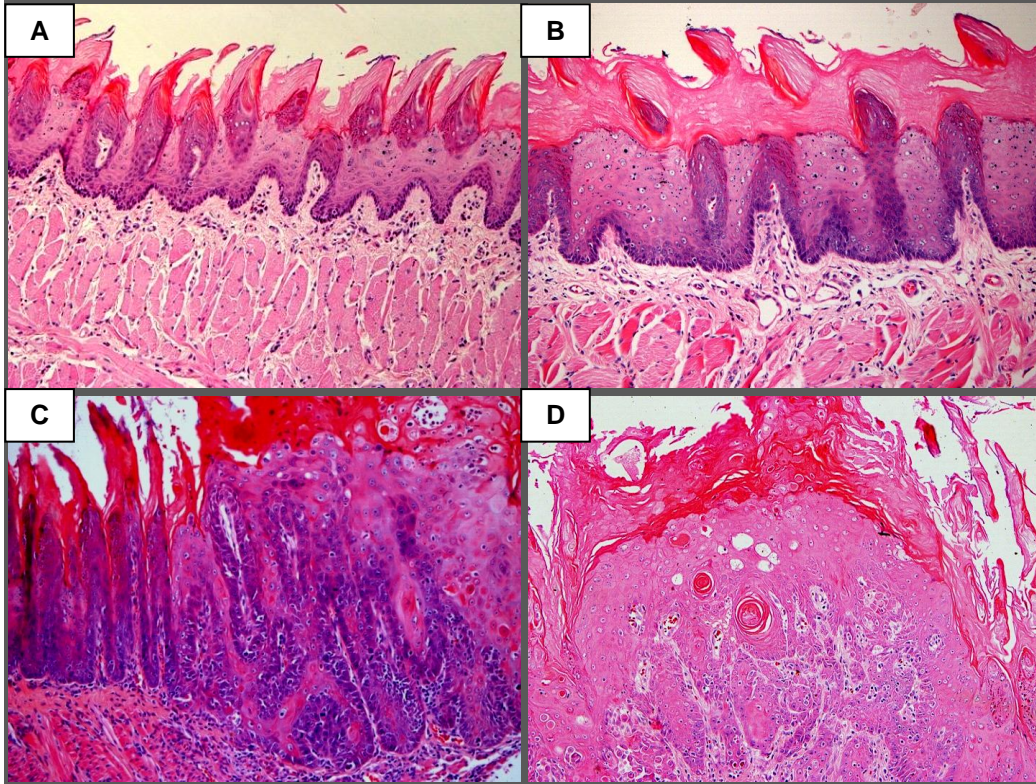
T20 houve mais do que uma lesão clínica. Em função disso, a análise macroscópica foi realizada de forma a permitir a avaliação dessas lesões separadamente. Os animais do grupo controle não apresentaram nenhum tipo de alteração e a mucosa do dorso da língua foi utilizada como referência para avaliação. Foram encontradas um total de 65 alterações histopatológicas, sendo as primeiras percebidas no grupo T4. Alguns sítios avaliados (5 do grupo T4 e 1 do grupo T12) não apresentaram alteração histopatológica e não foram incluídos nas avaliações subsequentes. Não houve avaliação de 2 sítios devido a problemas com o processamento da amostra.

A avaliação histopatológica das lesões diagnosticadas clinicamente como mancha/placa mostrou desde hiperplasia/hiperceratose até carcinoma espinocelular. Os nódulos variaram desde displasia epitelial severa até carcinoma espinocelular e as úlceras desde displasia epitelial moderada até carcinoma espinocelular.

**Tabela 3.** Incidência de lesões clínicas e alterações histopatológicas em língua de ratos submetidos ao modelo de carcinogênese induzida pela 4NQO.

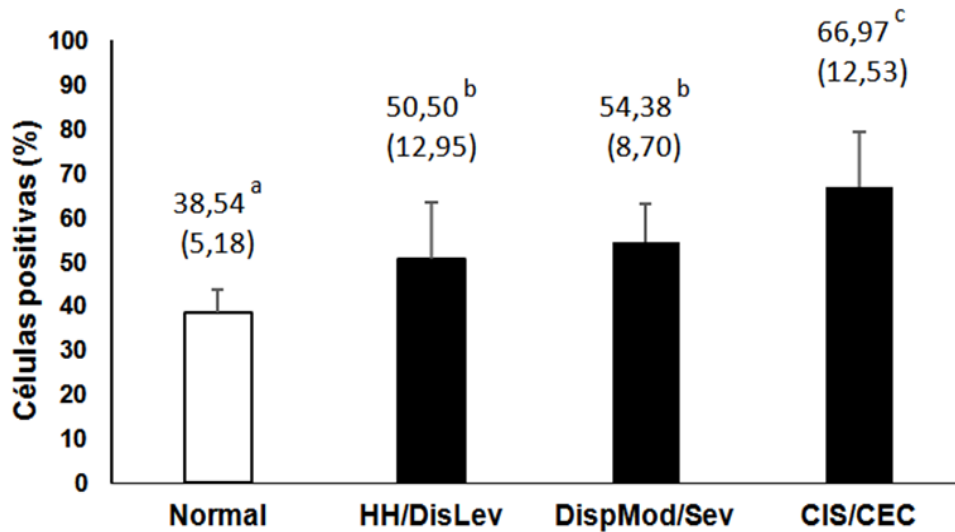
	Controle	T4	T12	T20
<b><u>Análise clínica</u></b>				
Mucosa normal	10	18	16	-
Mancha/placa	-	2	4	19
Nódulo	-	-	-	10
Úlcera	-	-	-	4
<b><u>Análise histopatológica</u></b>				
Sem alterações	10	5	1	-
Hiperplasia/Hiperceratose	-	6	1	-
Displasia				
- Leve	-	6	8	3
- Moderada	-	1	6	9
- Severa	-	-	4	5
Carcinoma <i>in situ</i>	-	-	-	7
Carcinoma espinocelular	-	-	-	9

**Figura 2.** Características histopatológicas observadas a partir do modelo 4NQO (A: Sem alterações histopatológicas, B: Hiperplasia/Hiperkeratose, C: Displasia epitelial severa, D: Carcinoma espinocelular. Hematoxilina-Eosina, 200x).



Os resultados da quantificação da imunomarcção de Ki-67 estão ilustrados no gráfico 1. Houve aumento no número de células positivas para Ki-67 ao longo dos estágios de alterações histopatológicas. Apenas entre HH/DisLev e DisMod/DisSev não houve diferença estatisticamente significativa.

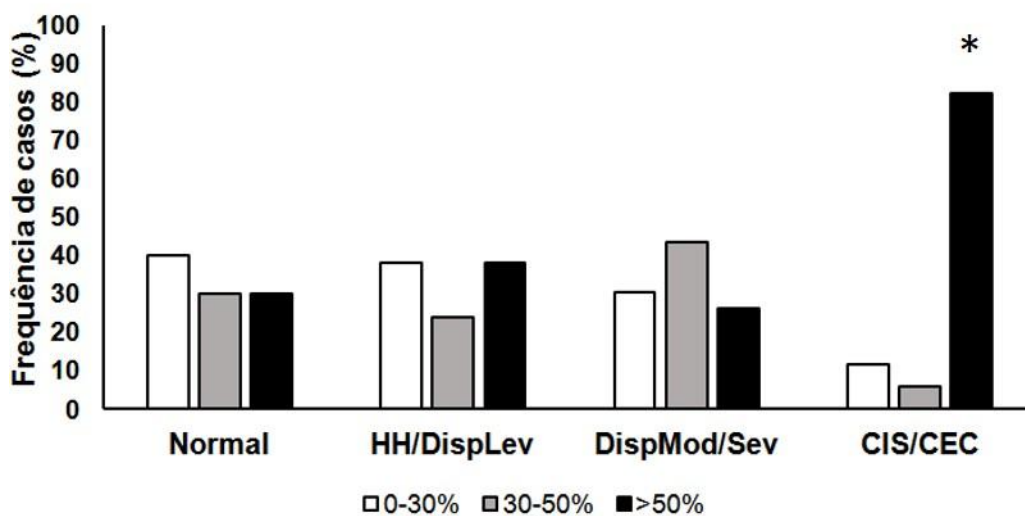
**Gráfico 1.** Quantificação da imunomarcação por Ki-67.



$p < 0.01$  (ANOVA/Tukey). Os valores representados no gráfico representam médias (desvios-padrão).

A partir da análise pelo teste do qui-quadrado observou-se uma associação do grupo CIS/CEC com uma maior frequência de casos com mais do que 50% de imunomarcação (Gráfico 2).

**Gráfico 2.** Escores de imunomarcação por BMI-1.

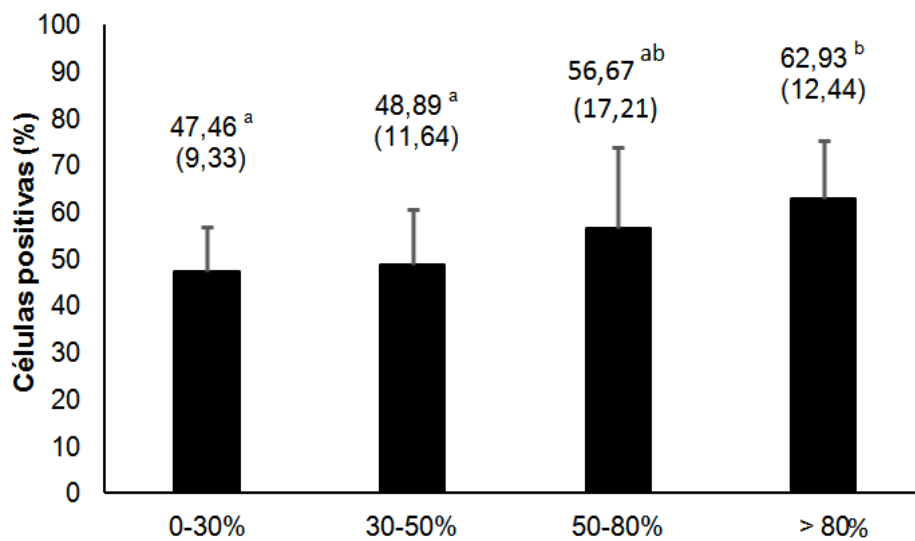


$p < 0.01$  (Qui-quadrado). Os valores representados no gráfico representam médias (desvios-padrão).

No gráfico 3 é ilustrado a associação entre as imunomarcações por BMI-1 e Ki-67. À medida que o percentual de imunomarcação por BMI-1 aumenta, a proliferação celular torna-se mais alta progressivamente.

A partir do teste de correlação de Spearman ( $R= 0,33 / p=0,03$ ) verificou-se que houve uma correlação fraca, mas significativa entre imunomarcação por BMI-1 e por Ki-67.

**Gráfico 3.** Associação entre as imunomarcações por BMI-1 e Ki-67.



$p < 0.01$  (ANOVA/Tukey).

## DISCUSSÃO

A carcinogênese bucal é um processo de múltiplas etapas que se torna evidente com o aparecimento de lesões clinicamente detectáveis. Ainda que em muitos casos o carcinoma espinocelular seja precedido pela leucoplasia, muitas vezes o CEC é detectado em estágios mais avançados (Rivera et al., 2014). O uso de modelos de carcinogênese experimental possibilita o estudo de alterações iniciais visando uma compreensão mais profunda deste processo (Herzig e Christofori, 2002).

Este é o primeiro estudo que avaliou alterações na proliferação e na imortalização celulares utilizando este modelo. Ainda que se saiba que os dois eventos sofrem mudanças em carcinomas espinocelulares (Tomatis, 1993; Vincent-Chong, 2015; Macluskey et al., 1999), não está claro se, durante a progressão tumoral, um precede o outro ou se os dois modificam-se simultaneamente. Este estudo mostrou que a proliferação celular aumenta gradualmente e que a imortalização celular aumenta no estágio mais avançado da progressão tumoral.

Os resultados do presente estudo mostraram que a proliferação celular aumentou progressivamente à medida que progrediram as alterações histopatológicas desde os estágios iniciais, sendo a maior marcação no CEC. Este achado está de acordo com Kaplan, Hochstadt e Dayan (2002), Liu et al. (2000) e Silva et al. (2007) que avaliaram proliferação celular a partir do uso de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em lesões obtidas a partir do modelo de carcinogênese bucal induzida experimentalmente. Da mesma forma, Sato et al. (2002), a partir da imunomarcação por Ki-67, reforçaram que a proliferação celular aumenta desde os estágios iniciais da progressão tumoral. Estudos enfocando nos mecanismos envolvidos mostraram que as vias de sinalização das moléculas ciclina D1 (Wilkey et al., 2009) e diacilglicerol (Tsuda et al., 2007) estão envolvidas nesta modulação da proliferação celular.

A avaliação da imunomarcação por BMI-1 aumentou de maneira evidente apenas no estágio mais avançado da progressão tumoral (CIS/CEC). Em contraste, Sumida et al. (1999) e Kim et al. (2001) demonstraram que a atividade da enzima telomerase, outro indicador de imortalização, aumentou rapidamente nos estágios iniciais da carcinogênese experimentalmente induzida, mostrando que este evento se modifica já no estágio de displasia moderada. Esse dado indica que a relação da



BMI-1 com imortalização celular não é tão direta. Outra razão para explicar esse resultado seria a participação da BMI-1 em outros eventos da carcinogênese como migração e invasão, servindo, ainda, como um marcador de prognóstico ruim (He et al., 2015). Os resultados encontrados no presente estudo, também mostraram associação entre as imunomarcações pelo Ki-67 e pelo BMI-1, demonstrando que proliferação celular e imortalização são eventos relacionados. Isso reforça os achados de Kang et al. (2007) que observaram redução da proliferação epitelial frente ao nocauteamento da proteína BMI-1.

Outro resultado interessante foi a imunomarcação pelo BMI-1 na mucosa normal dos animais que não receberam 4NQO. Isso vai de encontro aos dados encontrados por Luzar et al. (2004) e Kang et al. (2007) que mostraram ausência desta proteína ou marcação fraca em tecidos epiteliais normais. Contudo, pode-se afirmar que alguma proporção de células imortalizadas na camada suprabasal é esperada para prevenir morte celular precocemente durante a maturação epitelial. Segundo Lee et al. (2008), essa função seria importante para assegurar a renovação de epitélios estratificados.

A utilização de modelos de carcinogênese induzida em animais permite um controle sobre os níveis de exposição às substâncias que tem potencial carcinogênico e o estudo de diferentes estágios da progressão tumoral (Kanojia e Vaidya, 2006). Além disso, esse tipo de experimento possibilita avaliação da mucosa clinicamente normal de animais que receberam o carcinógeno. Isso permite a avaliação das alterações que ocorrem nos eventos precoces da carcinogênese, o que futuramente poderia contribuir no estabelecimento de medidas preventivas. Outra vantagem dos modelos de carcinogênese experimental é que em estudos com seres humanos a determinação do nível de exposição é imprecisa, pois os dados são obtidos a partir do relato dos pacientes. O modelo de carcinogênese induzida pelo 4NQO é um dos mais utilizados e reproduz alterações pré-malignas que ocorrem em seres humanos (Kanojia e Vaidya, 2006; Martínez, 2012). Nauta et al. (1995) compararam displasia epitelial em humanos e ratos a partir de graus de distúrbios de maturação epitelial, verificando que alterações histopatológicas induzidas por 4NQO são semelhantes às encontradas em humanos.

A partir deste modelo, a língua é o sitio anatômico onde mais aparecem lesões, provavelmente devido ao contato com o carcinógeno quando o mesmo é diluído na água de abastecimento (Carvalho et al., 2012; Ribeiro et al., 2004). Além

da mucosa lingual, outros sítios bucais podem apresentar lesões, como palato e gengiva (Ribeiro e Salvadori, 2007; Kaplan et al., 2002). O palato costuma apresentar alterações displásicas (2 semanas) quando o método de administração é aplicação tópica (Nauta et al., 1996). De forma semelhante ao que acontece em seres humanos, as lesões em gengiva aparecem tardiamente, indicando que esse sítio anatômico é mais resistente (Ribeiro e Salvadori, 2007). Contudo, a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos utilizando modelos de carcinogênese induzida em animais é difícil em função da ampla variação dos protocolos experimentais, em relação ao tempo de exposição aos carcinógenos, a via de administração e a dose do carcinógeno utilizada para indução de tumores (Martínez, 2012).

O aparecimento de lesões potencialmente malignas e malignas neste modelo parece ser proporcional ao tempo de ingestão do carcinógeno, semelhante ao observado em humanos com relação ao CEC (Franco et al., 1989). Interessantemente, em alguns animais tratados com 4NQO por períodos mais curtos de tempo, mucosas consideradas clinicamente normais apresentaram alterações histopatológicas que variaram desde hiperplasia epitelial/hiperceratose até displasia severa. Lesões classificadas clinicamente como manchas/placas em animais com menor tempo de exposição ao 4NQO (4 e 12 semanas) corresponderam a alterações mais brandas como hiperplasia epitelial e displasia epitelial leve. Em animais submetidos ao tempo experimental mais longo (20 semanas) foram observadas lesões de aspecto clínico semelhante, porém apresentando alterações histopatológicas mais graves, como carcinoma *in situ* e carcinoma espinocelular invasivo. Esse espectro amplo de alterações histopatológicas na manchas e placas reproduz o que se observa em leucoplasias observadas em humanos (Warnakulasuriya, 2008), reforçando a validade da utilização deste modelo para aumentar a compreensão da carcinogênese bucal em humanos.

Em conclusão, os resultados deste estudo indicam que proliferação e imortalização celulares são eventos relacionados e que proliferação celular aumenta gradualmente ao longo da progressão tumoral e que o aumento da imortalização se torna evidente no estágio tardio. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar os eventos que ocorrem durante a carcinogênese a fim de estabelecer possíveis preditores de transformação maligna.

## REFERÊNCIAS

- BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 48, n. 11, p. 3282-7, Jun 1988.
- BUDUNELI, N. et al. Matrix metalloproteinases -1, and Laminin-5 (gamma-2) chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. **J Periodontol**, v. 78, p.127–134, 2007.
- CARVALHO, J. G. et al. Alkylation-induced genotoxicity as a predictor of DNA repair deficiency following experimental oral carcinogenesis. **J Mol Histol**, v. 43, n. 2, p. 145-50, Apr 2012.
- FRACALOSSO, A. C. et al. Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 4, p. 325-33, Apr 2011.
- FRACALOSSO, A.C. et al. Wnt/beta-catenin signalling pathway following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 1, p. 176-83, Feb 2010.
- FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, v. 43, n. 6, p. 992-1000, Jun 1989.
- GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan 15 1983.
- GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, v. 22, n. 7, p. 658-61, Oct 2000.
- GOURIN, C. G.; JOHNSON, J. T. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the base of tongue. **Head Neck**, v. 23, n. 8, p. 653-60, Aug 2001.
- HAYRY, V. et al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Br J Cancer**, v. 102, n. 5, p. 892-7, Mar 2010.
- HE, Q. et al. Bmi1 drives stem-like properties and is associated with migration, invasion, and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Biol Sci**, v.11, n.1, p. 1-10, Jan 2015.
- HERZIG, M.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1602, n. 2, p. 97–113, 2002; Jun 2002.
- HONG, Y. et al. p16(CDKN2A) expression during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **Oral Oncol**, v. 45, n. 7, p. 640-4, Jul 2009.
- HUANG, D. et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 3, p. 465-73, Apr 2009.
- HUANG, W. Y. et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 6, p. 748-54, Dec 1994.

KANG, M.K. et al. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. **Br J Cancer**, v. 96, n.1, p. 126-33, Jan 2007.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 42, n. 7, p. 655-67, Aug 2006.

KAPLAN, I.; Hochstadt, T.; Dayan, D. PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. **Med Oral**, v. 7, n.5, p. 336-43, Nov-Dec 2002.

KIM, Y.W et al. Protein kinase C modulates telomerase activity in human cervical cancer cells. **Exp Mol Med**, v. 33, n.3, Sep 2001.

LAN, H. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa--a marker for poor tumor differentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness? **Anticancer Res**, v. 16, n. 5B, p. 3059-65, Sep-Oct 1996.

LEE, K. et al. Expression of Bmi-1 in epidermis enhances cell survival by altering cell cycle regulatory protein expression and inhibiting apoptosis. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 1, p.9-17, Jan 2008.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 9, p. 525-32, Oct 2004.

LING, W.; MIJITI, A.; MOMING, A. Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 4, p. 775-85, Apr 2013.

LIU, X.K. et al. Experimental study of abnormal cell proliferation and differentiation in rat tongue carcinogenesis induced by 4NQO. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v.9, n. 2, p.67-9, Jun 2000.

LUZAR, B. et al. Human telomerase catalytic subunit gene re-expression is an early event in oral carcinogenesis. **Histopathology**, v.45, n.1, p.13-9, Jul 2004.

MACLUSKEY, M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol**, v. 35, n. 4, p. 409-14, Jul 1999.

MARTÍNEZ, C. A. R. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Morphology**, p.309-314, 2012

MINICUCCI, E. M. et al. No mutations found in exon 2 of gene p16CDKN2A during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **J Mol Histol**, v. 40, n. 1, p. 71-6, Feb 2009.

MINICUCCI, E. M. et al. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63, n. 5, p. 483-9, Jul 2011.

MIRANDA, S. R. et al. Oxidative DNA damage is a preliminary step during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J Mol Histol**, v. 42, n. 2, p. 181-6, Apr 2011.

- MOON, S. M. et al. Homeobox C5 expression is associated with the progression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 6, p. 470-6, Jul 2012.
- NAOI, K. et al. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oncol Rep**, v. 23, n. 2, p. 337-44, Feb 2010.
- NAUTA, J.M. et al. Comparison of epithelial dysplasia-the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac**, v. 24, n.,p. 53-58, 1995.
- NAUTA, J.M. et al. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. **Head Neck**, v. 18, n.5, p. 441-9, Sep 1996.
- PARK, I. K.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. **J Clin Invest**, v. 113, n. 2, p. 175-9, Jan 2004.
- PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 3, p. 973-8, Jan 16 2007.
- RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D.M. Gingival Changes in Wistar Rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Eur J Dent**, v. 1, n.3, p. 152-7, Jul 2007.
- RIBEIRO, D. A. et al. Imbalance of tumor suppression genes expression following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **In Vivo**, v. 23, n. 6, p. 937-42, 2009 Nov-Dec 2009.
- RIBEIRO, D. A. et al. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 40, n. 9, p. 910-5, Oct 2004.
- RIVERA, C. et al. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 15, n.9, p. 5968-77, Aug 2014.
- RODRIGUEZ, T. et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncol**, v. 40, n. 2, p. 207-13, Feb 2004.
- SATO, K. et al. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Oncol**, v. 38, n. 8, p. 772-8, Dec 2002.
- SILVA, R.N. et al. Placental glutathione S-transferase correlates with cellular proliferation during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp Toxicol Pathol**, v. 59, n. 1, p. 61-8, Sep 2007.
- SONG, L. B. et al. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 12, p. 6225-32, Jun 2006.
- SUMIDA, T. Telomerase activation and cell proliferation during 7,12-dimethylbenzanthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. **Mol Carcinog**, v. 25, n.3, p. 164-8, Jul 1999.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ Health Perspect**, v. 101 Suppl 5, p. 149-51, Dec 1993.

- TSUDA, H. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 6, p 1013-9, Jun 2007.
- UMEMURA, T. et al. Lack of promotion activity of diacylglycerol oil on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in the oral cavity of SD rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 9, p. 3206-12, Sep 2008.
- VAN DER WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v.18, n.1, p. 33-37, Jan 2013.
- VERED, M. et al. The effect of desalivation on the malignant transformation of the tongue epithelium and associated stromal myofibroblasts in a rat 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis model. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 4, p. 314-23, Aug 2010.
- VINCENT-CHONG, V.K. et al. Genome-wide array CGH study on oral squamous cell carcinoma reveals immortalization of epithelial cells in oral carcinogenesis: A meta-analysis. **Head Neck**, doi: 10.1002/hed.24102, Apr 2015.
- WANG, Y. et al. Bmi-1 regulates self-renewal, proliferation and senescence of human fetal neural stem cells in vitro. **Neurosci Lett**, v. 476, n. 2, p. 74-8, May 31 2010.
- WARNAKULASURIYA, K. A.; MACDONALD, D. G. Epithelial cell kinetics in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 4, p. 165-9, Apr 1995.
- WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, Apr-May 2009.
- WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 3, p. 127-33, Mar 2008.
- WILKEY, J.F. et. al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. **Mol Carcinog**, v.48, n. 9, p. 853 – 6, Sep 2009.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Modelos de carcinogênese induzida experimentalmente são importantes, pois permitem um melhor detalhamento e compreensão das fases da progressão tumoral. A partir destes estudos, torna-se mais fácil o estudo de biomarcadores que possam ser cruciais para gerar novas perspectivas de diagnóstico e de tratamento. Mesmo havendo semelhanças entre os tecidos de animais e humanos, os resultados obtidos a partir de experimentos com animais devem ser analisados com cuidado, não sendo possível a sua extrapolação direta para humanos.

Os achados clínicos e histopatológicos deste trabalho contribuíram para que a metodologia aplicada no modelo de carcinogênese que utiliza 4-nitroquinolina 1-óxido seja consolidada como referência de modelo experimental para indução de lesões pré-malignas e formação de tumor propriamente dito e, dessa forma, colaborar com a investigação de novos mecanismos envolvidos nesse processo.

Este modelo tem potencial para aumentar a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento a partir da associação de fatores de risco para o desenvolvimento da doença como o álcool. Além disso, a possibilidade de estudar a capacidade de substâncias prevenirem ou atenuarem a formação de tumores parece promissora.

## REFERÊNCIAS

- BIAZEVIC, M. G. et al. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad. Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 22, no. 10, p. 2105-2114, Oct. 2006.
- BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v. 48, no. 11, p. 3282-3287, June 1988.
- DAYAN, D. et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, no. 2, p. 105-109, Mar. 1997.
- DE STEFANI, E. et al. The effect of smoking and drinking in oral and pharyngeal cancers: a case-control study in Uruguay. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 246, no. 1-2, p. 282-289, Feb. 2007.
- DU, X. et al. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, no. 2, p. 80-85, Feb. 2000.
- EINHORN, J.; WERSALL, J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. **Cancer**, New York, v. 20, no. 12, p. 2189-2193, Dec. 1967.
- EL-ROUBY, D. H. Histological and immunohistochemical evaluation of the chemopreventive role of lycopene in tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 56, no. 7, p. 664-671, July 2011.
- FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, Geneve, v. 43, no. 6, p. 992-1000, June 1989.
- GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**, Geneve, v. 31, no. 1, p. 13-20, Jan. 1983.
- GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, New York, v. 22, no. 7, p. 658-661, Oct. 2000.
- GOURIN, C. G.; JOHNSON, J. T. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the base of tongue. **Head Neck**, New York, v. 23, no. 8, p. 653-660, Aug. 2001.
- KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, no. 7, p. 655-667, Aug. 2006.
- KOONTONGKAEW, S. et al. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 36, no. 4, p. 334-9, July 2000.
- LAN, H. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa--a marker for poor tumor differentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness? **Anticancer Res.**, Athens, v. 16, no. 5B, p. 3059-3065, Sep./Oct. 1996.
- LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 33, no. 9, p. 525-532, Oct. 2004.



LING, W.; MIJITI, A.; MOMING, A. Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 71, no. 4, p. 775-785, Apr. 2013.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 18, no. 2, p. 541-550, Feb. 2009.

HAYRY, V. et al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Br. J. Cancer**, London, v. 102, no. 5, p. 892-897, Mar. 2010.

HOWIE, N. M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 7, no. 6, p. 349-354, Nov. 2001.

HUANG, D. et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 18, no. 3, p. 465-473, Apr. 2009.

HUANG, W. Y. et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 78, no. 6, p. 748-754, Dec. 1994.

MACCLUSKEY, M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 4, p. 409-414, Jul. 1999.

MARTÍNEZ, C. A. R. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. of Morphol.**, Temuco, v. 30, no. 1, p. 309-314, Mar. 2012.

MINICUCCI, E. M. et al. No mutations found in exon 2 of gene p16CDKN2A during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **J. Mol. Histol.**, Dordrecht, v. 40, no. 1, p. 71-76, Feb. 2009.

MINICUCCI, E. M. et al. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp. Toxicol. Pathol.**, Jena, v. 63, no. 5, p. 483-489, Jul. 2011.

MIRANDA, S. R. et al. Oxidative DNA damage is a preliminary step during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J. Mol. Histol.**, Dordrecht, v. 42, no. 2, p. 181-186, Apr. 2011.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, no. 5, p. 448-460, May 2006.

NISHIMURA, A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 78, no. 6, p. 1264-1269, June 1999.

NUNOSHIBA, T.; DEMPPE, B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. **Cancer Res.**, Chicago, v. 53, no. 14, p. 3250-3252, July 1993.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 104, no. 3, p. 973-978, Jan. 16 2007.

RIBEIRO, D. A. et al. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral. Oncol.**, Oxford, v. 40, no. 9, p. 910-915, Oct. 2004.

- RIBEIRO, D. A. et al. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v. 83, no. 1, p. 131-137, Aug. 2007.
- RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, M. E. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 86, no. 6, p. 375-381, Dec. 2005.
- RODRIGUEZ, T. et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, no. 2, p. 207-213, Feb. 2004.
- SAKAKI, T. et al. Changing expression of E- and P-cadherin during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J. Oral Pathol, Med.**, Copenhagen, v. 32, no. 9, p. 530-537, Oct. 2003.
- SILVERMAN, S. et al. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. **Cancer**, New York, v. 38, no. 4, p. 1790-1795, Oct. 1976.
- TANG, X. H. et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 10, no. 1 Pt 1, p. 301-313, Jan. 2004.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ Health Perspect.**, Research Triangle Park, v. 101, no. 5, p. 149-151, Dec. 1993.
- VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 43, no. 10, p. 999-1006, Nov. 2007.
- VERED, M. et al. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 5, p. 491-496, July 2003.
- WARNAKULASURIYA, K. A.; MACDONALD, D. G. Epithelial cell kinetics in oral leukoplakia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, no. 4, p. 165-169, Apr 1995.
- WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, Copenhagen, v. 45, no. 4-5, p. 309-316, 2009 Apr./May 2009.
- WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 37, no. 3, p. 127-133, Mar. 2008.
- WILKEY, J. F. et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. **Mol. Carcinog.**, New York, v. 48, no. 9, p. 853-861, Sept. 2009.

**APÊNDICE A - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA MUCOSA NORMAL E DAS DIFERENTES LESÕES INDUZIDAS A PARTIR DO MODELO 4NQO**

**A: Mucosa normal**



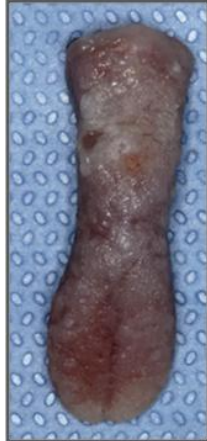
**B: Mancha/Placa**



**C: Nódulo**

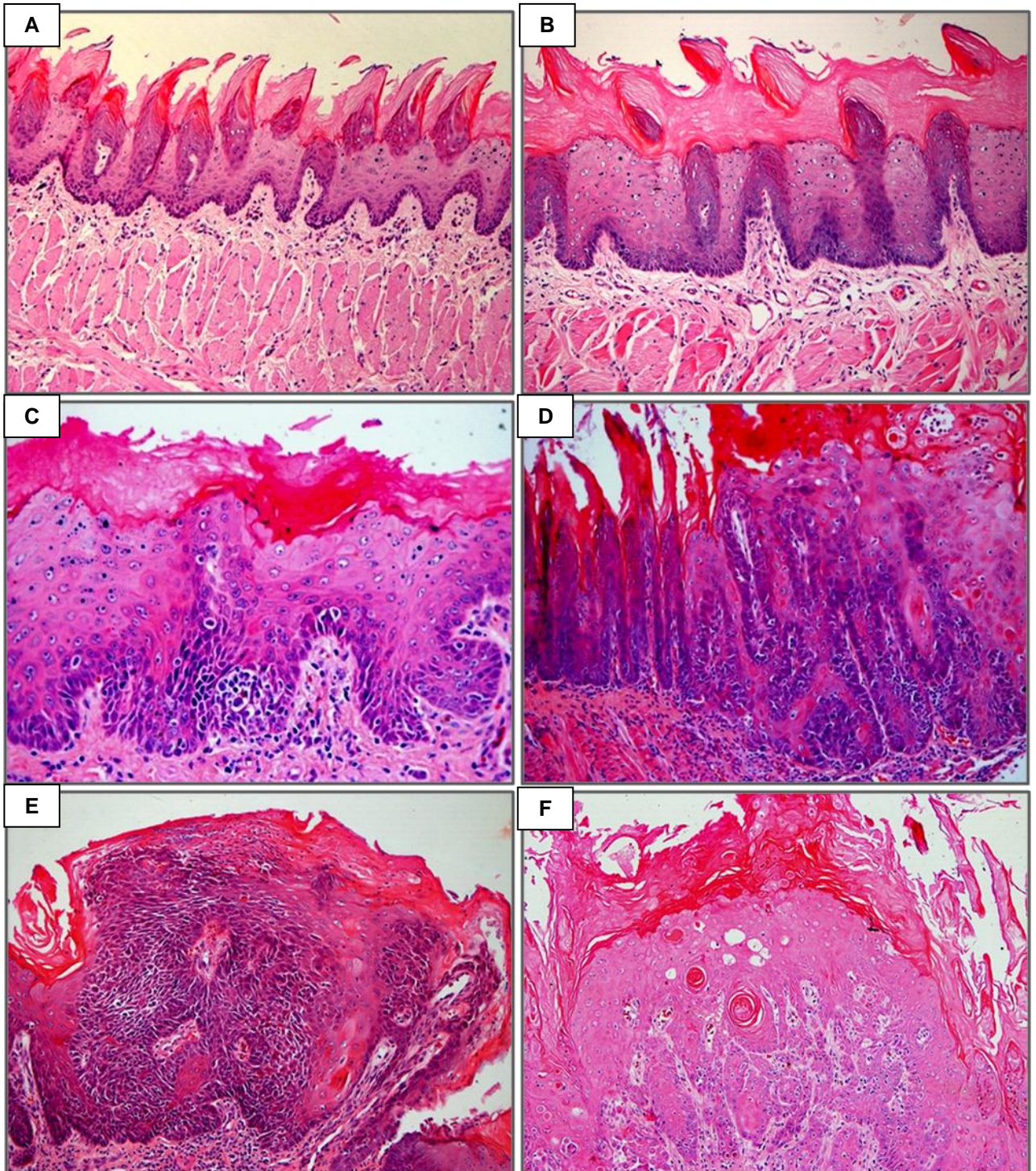


**D: Úlcera**





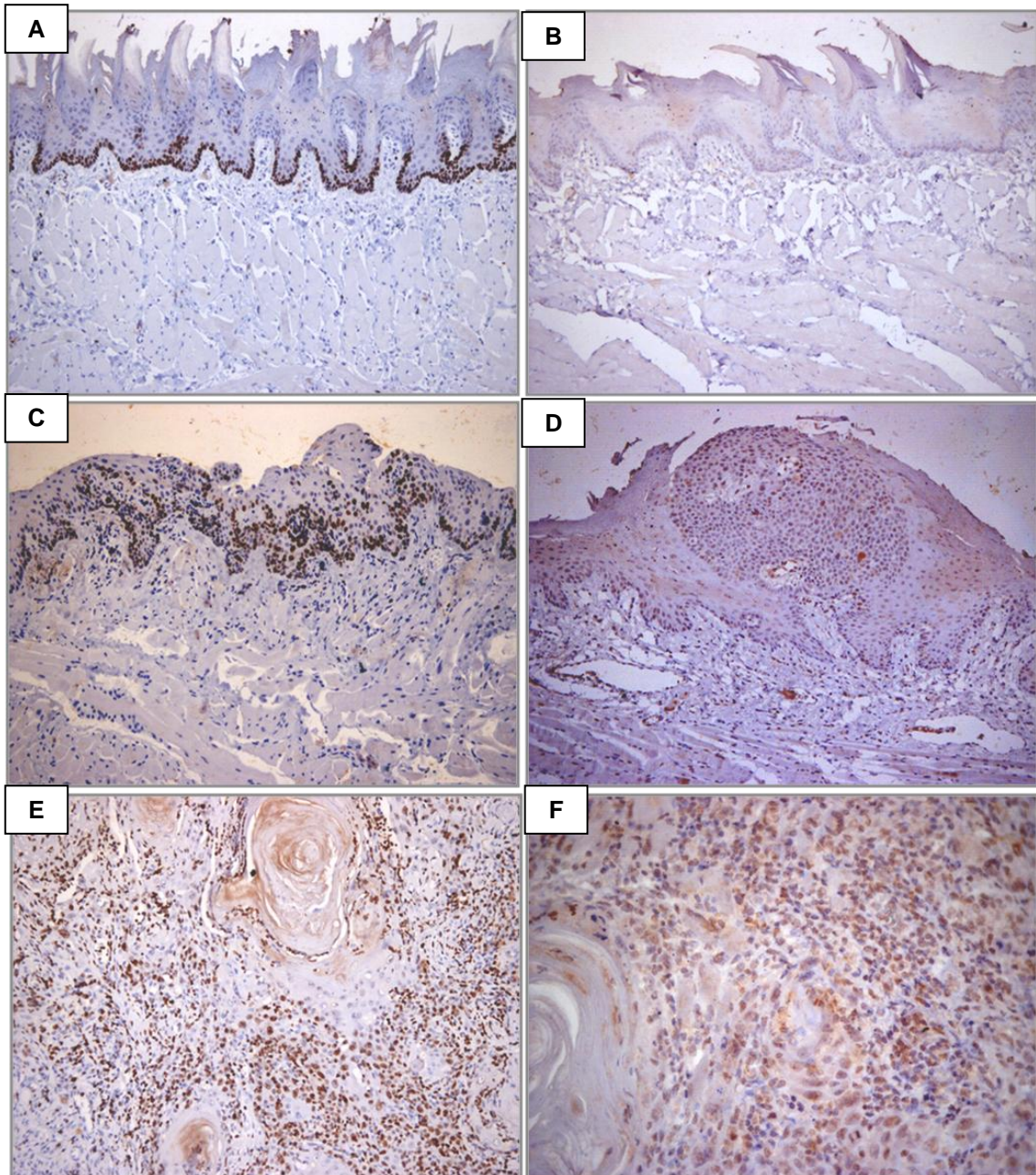
**APÊNDICE B - CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS OBSERVADAS A PARTIR DO MODELO 4NQO**



A: Sem alterações histopatológicas, B: Hiperplasia/Hiperkeratose, C: Displasia epitelial leve, D: Displasia epitelial severa, E: Carcinoma *in situ*, F: Carcinoma espinocelular Hematoxilina-Eosina (200x e 400x).



### APÊNDICE C – IMUNOMARCAÇÃO POR Ki-67 E BMI-1



A: Ki-67 (sem alterações histopatológicas), B: BMI-1 (sem alterações histopatológicas), C: Ki-67 (Displasia epitelial moderada),  
 D: BMI-1 (Carcinoma *in situ*), E: Ki-67 (Carcinoma espinocelular),  
 F: BMI-1 (Carcinoma espinocelular)  
 Imunomarcação por Ki-67 e por BMI-1 (200x e 400x).

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 140049

**Data da Versão do Projeto:**

**Pesquisadores:**

VINICIUS COELHO CARRARD

LUISE MEURER

MANOELA DOMINGUES MARTINS

ISADORA PERES KLEIN

CHEYENNE COSCIA BUENO

MICHAEL EVERTON ANDRADES

**Título:** AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E DA IMORTALIZAÇÃO CELULARES NO EPITELIO BUCAL DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CARCINOGENESE INDUZIDA PELA 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO)

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 12 de março de 2014.

Prof<sup>a</sup> Iraci Lucena da Silva Torres  
Coordenadora CEUA/HCPA

## ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 26564

**Título:** AVALIACAO DA PROLIFERACAO E DA IMORTALIZACAO CELULARES NO EPITELIO BUCAL DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CARCINOGENESE INDUZIDA PELA 4-NITROQUINOLINA 1-OXIDO (4NQO)

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

VINICIUS COELHO CARRARD - coordenador desde 21/04/2014  
MANOELA DOMINGUES MARTINS - pesquisador desde 21/04/2014  
MICHAEL ÉVERTON ANDRADES - pesquisador desde 21/04/2014  
LUISE MEURER - pesquisador desde 21/04/2014  
CHEYENNE COSCIA BUENO - Outra Função desde 21/04/2014  
ISADORA PERES KLEIN - Aluno de Mestrado desde 21/04/2014

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 43 ratos (Rattus norvegicus albinos) machos adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Julho de 2014

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética