

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - PERIODONTIA

Linha de pesquisa:

Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

Dissertação:

EFEITO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE LÍNGUA INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO
(4NQO) EM RATOS WISTAR

TOBIAS RAUBER SPULDARO

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Spuldaro, Tobias Rauber
EFEITO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR
LIGADURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-
ÓXIDO (4NQO) EM RATOS WISTAR / Tobias Rauber
Spuldaro. -- 2013.
53 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Câncer de língua. 2. Doença periodontal. 3. Ratos
. 4. 4NQO. I. Rösing, Cassiano Kuchenbecker, orient.
II. Título.

TOBIAS RAUBER SPULDARO

EFEITO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE LÍNGUA INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO
(4NQO) EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Nível Mestrado da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como pré-requisito final para obtenção do título
de Mestre em Clínica Odontológica – Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

PORTO ALEGRE

2013

DEDICATÓRIA

“Mude suas opiniões e mantenha seus princípios. Troque suas folhas, mas mantenha suas raízes, pois é preciso encontrar as suas raízes antes de ver o mundo florido.”

Adaptado por Victor Hugo e Erik Vinicios

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmão por serem as minhas raízes.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha família que fez com que fosse viável, em todos sentidos, a conclusão desta dissertação. Aos meus pais (Cesar e Eliane) que sempre me mostram os caminhos certos e com quem aprendi os meus princípios de vida. Acredito que isso é o que se tem de mais valioso para se passar a um filho. Da mesma maneira, agradeço ao meu irmão (Douglas) por me ensinar que a vida é feita de escolhas e que deve-se refletir sobre cada uma delas, em todos sentidos, para tomarmos decisões sábias, que foi o caso deste mestrado. A minha namorada (Kamille), por estar sempre junto, apesar de um bom tempo pela distância, me apoiando e incentivando em todos os momentos nestes últimos 5 anos.

Ao meu orientador (Cassiano Rösing) pela confiança e por esta oportunidade de trabalho. Me lembro bem a primeira vez que conversamos e me estendeu a mão e me cedeu a oportunidade de atividades na faculdade. Minha admiração por ti foi cada vez ficando maior a medida que o tempo foi passando. Na minha opinião, o senhor é um orientador completo e um exemplo que tentarei seguir. A parceria do professor Marcelo Lamers que gentilmente disponibilizou o espaço e ferramentas para que este trabalho fosse concretizado. Os dois corresponderam acima das expectativas quando solicitados. Aos dois meu muito obrigado pelos ensinamentos.

Agradeço também pelo presente em que o mestrado me proporcionou de ter dois novos irmãos: Harry Rivera e Marcelo Ribas. Como dizem: “Amigos verdadeiros não são os que dizem que está tudo certo sempre, e sim, os que te ajudam a enxergar os erros, e também te ajudam a corrigi-los”. Obrigado por serem amigos verdadeiros. De forma igual, todos nós temos mérito do início até o fim deste trabalho.

A todos colegas de academia, principalmente os da periodontia e da patologia, que diretamente e indiretamente disponibilizaram tempo e dividiram conhecimento desde o projeto, na parte experimental e na análise dos resultados deste trabalho. Alessandro Menna, Bárbara Capitano, Eduardo Gaio, Grasieli Ramos, Jeferson Sanada, Juliano Cavagni, Lorena Orlandini, Roger Junges, Vágner Soster e ao pessoal do ICBS meu muito obrigado.

RESUMO

Estudos publicados recentemente têm sugerido uma possível associação entre câncer e doença periodontal. A avaliação do impacto da doença periodontal sobre a patogênese de câncer de língua não foi estudada até o presente momento. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da presença de doença periodontal induzida por ligadura e o desenvolvimento experimental de câncer de língua pelo carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) em ratos Wistar. Foram utilizados 72 ratos machos Wistar com 60 dias de idade distribuídos em três grupos experimentais: Grupo 4NQO, no qual os animais foram expostos a uma solução de 50 ppm do carcinógeno por 140 dias; Grupo Ligadura+4NQO, no qual foi induzida a doença periodontal por meio de ligadura no segundo molar superior direito por 14 dias e, após, exposição ao 4NQO por mais 140 dias; Grupo 4NQO+Ligadura, no qual os animais foram expostos ao 4NQO por 140 dias, após os quais doença periodontal foi induzida por ligadura durante 14 dias. O peso dos animais foi monitorado ao longo do estudo. Os animais foram mortos ao final do experimento e as peças maxilares e línguas foram analisadas em relação a perda óssea alveolar e lesões histopatológicas. Cinquenta e seis animais completaram o estudo. Não houve diferenças estatisticamente significativas na perda óssea alveolar no lado que não recebeu colocação de ligaduras; no lado com ligaduras houve uma maior perda óssea nos grupos a elas expostos. Observou-se uma menor ocorrência de carcinoma bem diferenciado nos animais que apresentavam, desde o início da exposição ao carcinógeno, a presença de inflamação periodontal ($p < 0,05$). Conclui-se que a presença de inflamação periodontal parece ter potencial de modular o processo de carcinogênese.

Palavras-chave: câncer de língua, doença periodontal, ratos, 4NQO.

ABSTRACT

Recent studies have suggested a possible association between cancer and periodontal disease. The evaluation of the impact of periodontal disease on the pathogenesis of tongue cancer has not been studied up to the present moment. Therefore, the objective of this study was to analyze the effect of the presence of ligature induced periodontal disease on the experimental development of tongue cancer by the carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) in Wistar rats. Seventy-two 60-day-old male Wistar rats were distributed in three experimental groups: Group 4NQO, in which animals were exposed to a 50 ppm solution of the carcinogen for 140 days; Group Ligature+4NQO, in which the periodontal disease was induced by ligature in the second upper molar for 14 days and, after, the exposition to 4NQO for more 140 days; Group 4NQO+Ligature, in which the animals were exposed to 4NQO for 140 days, and, after, periodontal disease was induced for 14 days. Weight of the animals was monitored during the whole study. Animals were sacrificed at the end of the experiment and the maxillary specimens and the tongues were analyzed in relation to alveolar bone loss and histopathological alterations. Fifty-six animals completed the study. No statistically significant difference was observed in the sides without ligatures; a higher degree of bone loss was observed in the side that received ligature. There was a lower occurrence of well-differentiated squamous cell carcinoma in the animals that presented, from the beginning of the exposition to the carcinogen, the presence of periodontal inflammation ($p < 0,05$). It may be concluded that the presence of periodontal inflammation seems to be a potential modulator of the carcinogenic process.

Keywords: tongue cancer, periodontal disease, rats, 4NQO.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	11
1.1	CÂNCER BUCAL	11
1.2	DOENÇA PERIODONTAL	12
1.3	RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E CÂNCER BUCAL	14
1.4	DOENÇA PERIODONTAL EM MODELOS ANIMAIS	22
1.5	CARCINOGENESE BUCAL COM O USO DE 4NQO EM MODELOS ANIMAIS	23
2	PROPOSIÇÃO	25
3	HIPÓTESE	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	26
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	27
4.3	MODELO ANIMAL	27
4.4	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	27
4.4.1	Cálculo Amostral	27
4.4.2	Constituição dos Grupos Experimentais	28
4.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
4.5.1	Exposição ao 4NQO	28
4.5.2	Indução de Perda Óssea Alveolar	29
4.5.3	Peso dos Animais	29
4.5.4	Morte dos Animais	29
4.5.5	Obtenção das Peças Maxilares	30

4.5.6	Análise Morfométrica de Destruição Óssea	30
4.5.7	Análise Macroscópica e Histológica das Línguas	31
4.6	CUIDADOS PARA A PROTEÇÃO DO PESQUISADOR	32
4.6.1	Manuseio de Reagentes e Solventes	32
4.6.2	Procedimentos de Descarte dos Materiais Biológico, Cortante e Tóxicos	33
5	CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO	34
5.1	CEGAMENTO	34
5.2	REPRODUTIBILIDADE	34
6	ANÁLISE DE DADOS	34
6.1	HIPÓTESE ESTATÍSTICA	34
6.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
7	RESULTADOS	35
8	DISCUSSÃO	39
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS	52

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como foco de estudo a inter-relação entre o câncer oral e a patogênese da doença periodontal. Para isso, foi realizado um protocolo de indução de carcinogênese lingual com a utilização do carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) e indução de doença periodontal destrutiva, por meio da técnica de ligadura, em modelo experimental (ratos Wistar). Esta dissertação faz parte de um amplo projeto desenvolvido pelo grupo de pesquisa onde experimentos paralelos e complementares estão sendo conduzidos. O financiamento deste estudo aqui apresentado esteve sob a responsabilidade do edital Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD NF-2008 CAPES).

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 CÂNCER BUCAL

Câncer é uma das quatro principais doenças crônicas responsáveis pelo maior número de mortes no mundo (PETERSEN e BAEHNI, 2012). Dentre todos os tipos de câncer, o câncer bucal é considerado o sexto tipo mais comum em humanos, sendo o carcinoma epidermóide com a maior prevalência e representa cerca de 90% das malignidades bucais (SILVERMAN, 2001). Acredita-se que se tenha mais de 300 mil casos de carcinoma epidermóide a cada ano no mundo e uma taxa de mortalidade de 50% em cinco anos (WARNAKULASURIYA, 2009; RIVERA, 2012). Este mau prognóstico se dá pelo fato de o diagnóstico ser feito em um estágio muito avançado, pois muitas vezes o câncer bucal se apresenta assintomático (LAMBERT et al., 2011).

No Brasil, a incidência do câncer bucal ocupa a quinta posição para homens (estimativa de 9.990 novos casos para 2012) e a sétima posição para mulheres (estimativa de 4.180 novos casos para 2012) com a neoplasia maligna mais incidente sendo o carcinoma epidermóide (BRASIL, 2013). As localizações mais frequentes relacionadas ao carcinoma epidermóide bucal são a língua, seguido pelo assoalho bucal e o lábio inferior (BRENER, 2007).

As péssimas estatísticas de incidência de câncer de boca e de sua sobrevivência mantiveram-se praticamente inalteradas ao longo das últimas três décadas, apesar do maior acesso ao exame da cavidade bucal, de esforços diretos de prevenção contra fatores de risco e dos avanços do tratamento e do diagnóstico. Esses avanços suscitam que novas abordagens devem ser propostas para mudar este quadro (GONDIVKAR et al., 2013). Por estes motivos, o câncer bucal foi considerado recentemente como uma das prioridades de ações pela Organização Mundial da Saúde (PETERSEN, 2009).

Já existem vários fatores de risco identificados para o surgimento de câncer bucal como o fumo, álcool, infecções virais, fatores nutricionais, fatores genéticos e também por infecções bacterianas crônicas (SCULLY, 2011). Álcool e fumo já estão estabelecidos como os fatores de risco predominantes, mas uma das novas hipóteses que vem sendo estudada é que as infecções bucais resultam em um processo inflamatório e podem causar uma transformação maligna nos tecidos bucais e de outros órgãos, mas

ainda as evidências científicas não estão totalmente claras para explicar este fenômeno (MEURMAN e BASCONES-MARTINEZ, 2011).

Estima-se que a infecção crônica e a inflamação desempenham um papel de 15 a 20% de todas as malignidades e que os causadores para esta transformação maligna dos tecidos são os eventos genéticos, os leucócitos infiltrativos tumorais e os principais reguladores da inflamação do câncer (ALLAVENA et al., 2008). Em geral, a associação entre o câncer, as infecções crônicas e o processo de inflamação é caracterizada pela alta prevalência nas populações, persistência no hospedeiro e um longo período de latência antes do câncer estar estabelecido (MEURMAN e BASCONES-MARTINEZ, 2011).

1.2 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal tem uma alta prevalência na população mundial e representa uma das duas doenças bucais mais importantes que contribuem para a carga global de doenças crônicas. (PETERSEN e OGAWA, 2005). Acredita-se que a doença periodontal afeta em torno de 40 a 50% da população adulta no mundo, aumentando com o avançar da idade dos indivíduos. Além disso, estima-se que as formas mais graves da doença periodontal atinjam uma prevalência de aproximadamente 10% da população em países desenvolvidos (HUGOSON e NORDERYD, 2008).

Recentemente um estudo epidemiológico com pacientes idosos realizado no sul do Brasil relatou uma prevalência de 79% de periodontite sendo que, nessa população, 94,1% dos pacientes e 60,5% dos dentes apresentaram uma perda de inserção maior que cinco milímetros, o que significa que uma grande parte desta população teve doença periodontal grave. Além disso, somente 8,5% desses indivíduos possuíam mais de 20 dentes e 39,5% eram edêntulos totais (GAIO et al., 2012). Do mesmo levantamento, foi verificado que adultos com idade entre 40 a 49 e acima de 50 anos tiveram 3 e 6 vezes mais chances de perda de inserção moderada (acima de cinco milímetros), e, 7 e 25 vezes mais chances de perda de inserção severa (acima de sete milímetros), respectivamente, quando comparado a pacientes com idade entre 30 a 39 anos (SUSIN et al., 2004).

As doenças periodontais são caracterizadas pela infecção crônica por bactérias bucais que resulta em uma inflamação das gengivas e pode avançar para uma destruição gradual do tecidos periodontais e do osso alveolar que suporta o dente (MICHAUD et al., 2008). Assim, gengivite e periodontite são os grandes grupos de doenças periodontais.

A primeira forma de manifestação da doença periodontal é a gengivite, que refere-se à inflamação dos tecidos gengivais sem sinais de perda dos tecidos de suporte (afeta cerca de 90% da população mundial) e a segunda é a periodontite que caracteriza-se pela inflamação dos tecidos de sustentação e pode progredir e causar danos irreparáveis como a perda de inserção e de tecido ósseo (PIHLSTROM, MICHALOWICZ, JOHNSON, 2005). Vale lembrar que a infecção bacteriana não é o suficiente para induzir a iniciação ou a progressão da doença periodontal, pois os fatores derivados das bactérias estimulam uma resposta inflamatória local e ativação do sistema imune inato e faz com que cada hospedeiro responda diferente, sendo uns mais e outros menos suscetíveis à doença (TABA, SOUZA, MARIGUELA, 2012).

Há um interesse crescente nos últimos anos em interligar a doença periodontal como um fator de risco independente para um número significativo de doenças sistêmicas o que trouxe uma mudança na lógica sobre causalidade e a direcionalidade de associações bucais e sistêmicas (ERDEMIR, NALCACI, CAGLAYAN, 2008). Essa ligação pode se dar através de periodontopatógenos e pela inflamação periodontal pela dinâmica do periodonto e suas substâncias inflamatórias na circulação, alterações hormonais e mecanismos de resposta imune (GULATI et al., 2013). Por exemplo, as bactérias da doença periodontal estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e/ou proteínas em fase aguda em algum lugar distante, o que poderia iniciar ou intensificar um processo de doença, sendo que estas bactérias também podem circular para outras mucosas, causando infecção e inflamação nestes locais (SCANNAPIECO, 2005).

Várias são as doenças sistêmicas que tem indícios para uma associação com a doença periodontal como a doença cardiovascular, doença cerebrovascular, diabetes, partos prematuros, pré-eclâmpsia, infecções respiratórias, osteoporose, câncer, artrite reumatóide, disfunção erétil, doença de Alzheimer, doença gastrointestinal, prostatite e doenças renais (GULATI et al., 2013). Entretanto, muitas destas associações já estão

bem estabelecidas e outras ainda necessitam de maiores investigações para se confirmar a verdadeira relação entre elas.

1.3 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E CÂNCER BUCAL

As evidências na literatura que suportam uma possível relação entre doença periodontal e câncer bucal são crescentes (Quadro 1). Grande parte das evidências apresenta como parâmetro de doença periodontal a perda dentária o que seria um fator confundente, pois a perda dentária pode se dar além da doença periodontal como por exemplo, por cárie e por trauma (FITZPATRICK e KATZ, 2010). Entretanto, na literatura se encontram também estudos bem conduzidos e que não utilizam perda dentária como parâmetro periodontal, mas, sim, a verificação de experiência de perda tecidual periodontal. Nesses estudos, quando o diagnóstico periodontal é realizado através de radiografias e exames clínicos, observa-se que existe um aumento de cinco vezes a mais do risco de câncer de língua para cada milímetro de perda óssea alveolar e, clinicamente, quatro vezes a mais quando se tem uma perda de inserção clínica acima de 1,5 mm. (TEZAL, GROSSI, GENCO, 2005; TEZAL et al., 2009)

O Quadro 1 resume os principais estudos publicados até o momento a respeito da possível interrelação entre doença periodontal e câncer bucal.

Quadro 1 Resumo dos estudos de associação entre doença periodontal e câncer bucal de acordo com a ordem cronológica de publicação

	População	Tipo de Estudo	Diagnóstico de Câncer Bucal	Critério para Doença Periodontal	Principais Achados	Ajuste para Fatores
Zheng et al. 1990 China	404 pacientes	Caso-controle	Câncer bucal	Perda dentária	Aumento significativo de risco de câncer bucal com aumento do número de dentes perdidos (mais de 15 dentes perdidos, OR 5,3 para homens e OR 7,3 para mulheres).	Fumo e álcool
Marshall et al. 1992 Estados Unidos	290 pacientes	Caso-controle	Diagnóstico de câncer em registros patológicos	Perda dentária	Aumento significativo de câncer bucal (OR 2,7) com perdas de 11 ou mais dentes.	Fumo e álcool.
Bundgaard et al. 1994 Dinamarca	161 pacientes com carcinoma epidermóide bucal 400 pacientes controle	Caso-controle	carcinoma epidermóide em mucosa jugal, gengiva, palato duro, língua, região retromolar e assoalho de boca	Perda dentária	Aumento significativo o risco de carcinoma epidermóide em pacientes com menos de 15 dentes quando ajustado para tabaco e álcool (OR 2,4).	Fumo, álcool, condições dentárias, estado civil e residência

Talamini et al. 2000 Itália	280 pacientes	Caso-controle	Casos de câncer bucal e de orofaringe em 3 hospitais do nordeste da Itália	Perda óssea alveolar	Não houve aumento significativo de risco de câncer bucal relacionado à perda de 16 ou mais dentes, contudo, condição precária bucal foi associada (OR 4,5), mesmo após ajuste para álcool e fumo.	Fumo e álcool
Fernandez – Garrote et al. 2001 Cuba	200 casos de câncer bucal e orofaringe e 200 controles	Caso-controle	Câncer bucal e de orofaringe	Perda dentária	Aumento significativo de câncer bucal (OR 2,7) em pacientes com perda de 16 ou mais dentes, após ajuste para fumo e consumo de álcool.	Fumo, álcool , variáveis sócio-demográficas e dieta
Hujoel et al. 2003 Estados Unidos	11328 adultos 25-74 anos	Longitudinal	Mortalidade de câncer	Índice de Russel	Aumento significativo de risco para câncer pulmonar (OR 1,48), sem aumento significativo de risco para outros tipos de câncer, incluindo câncer bucal.	Fatores de risco para câncer pulmonar, gênero e idade.
Rosenquist et al. 2005 Suécia	132 casos de tumores 320 controles	Caso-controle	Estágios de carcinoma epidermóide de I a IV de língua, assoalho de boca, da cavidade bucal e orofaringe	Perda dentária Radiografias panorâmicas e periapicais para a perda óssea horizontal e angulares	Aumento significativo o risco de ter carcinoma para higienização razoável (OR 2) e pobre (OR 5,3) álcool e para perda de mais de 20 dentes (OR 3,4) após ajuste para fumo e álcool Houve aumento de risco para perda óssea radiográfica, mas não quando ajustado para fatores.	Fumo, álcool , idade, gênero, condições e número de dentes e educação

Tezal et al. 2005 Estados Unidos	131 pacientes com tumor e 323 pacientes com lesões pré-cancerígenas de 13798 pacientes	Coorte	Tumor Lesões pré-cancerígenas Lesões bucais em tecido mole	Severidade da doença periodontal através da perda de inserção PI \geq 1,5 mm	Aumento significativo de se ter tumor bucal (OR 4,57) e lesões pré-cancerígenas (OR 1,55) com PI 1,5 mm em não fumantes.	Idade, gênero, número de dentes, etnia/raça, educação, fumo e álcool
Guha et al. 2007 Brasil	924 casos de câncer bucal e orofaríngeo e 928 controles na Europa; 2286 casos e 1824 controles na América Latina	Caso-controle	Câncer bucal e de orofaringe	Condição dental ao exame (boa, regular, pobre) aferida por presença de cálculo, sangramento, irritação da mucosa e presença de cárie. Perda dentária	Condição bucal pobre significou aumento de risco para câncer de cabeça e pescoço (OR 2,89 na Europa e OR 1,89 na América Latina). Doença periodontal (indicada pela pobre condição de saúde bucal e perda de dentes) e uso diário de colutório podem ser fatores independentes associados ao câncer de cabeça, pescoço e esôfago.	Fumo e álcool
Tezal et al. 2007 Estados Unidos	51 pacientes com carcinoma epidermóide de língua 54 pacientes controle	Caso-controle	Carcinoma epidermóide de língua	Perda óssea alveolar através de radiografias panorâmicas (em mm)	Aumento significativo do risco de carcinoma epidermóide de língua para cada milímetro de perda óssea alveolar (OR 5,23) quando ajustado para fumo, número de dentes e idade.	Fumo, número de dentes, idade, condições dentária e etnia/raça
Rezende et al. 2008 Brasil	50 pacientes com carcinoma epidermóide de origem orofaríngeo 50 pacientes controle	Caso-controle	Câncer bucal e de orofaringe	CPI e CPOD	76% dos indivíduos do grupo com câncer apresentaram PS > 6mm comparados a 10% do grupo controle. Não houve cálculo de razão de risco (OR), e não houve associação com DMFT.	-

Hiraki et al. 2008 Japão	429 pacientes com câncer de cabeça e pescoço de 5240 pacientes com câncer 10.480 controles	Caso-controle	Câncer de cabeça e pescoço	Perda dentária	Aumento significativo para câncer de cabeça e pescoço para o número reduzido de dentes (OR 1,68 para desdentados) após ajuste para fumo e álcool.	Fumo, álcool, número de dentes, dieta, gênero e idade
Michaud et al. 2008 Estados Unidos	48328 pacientes	Coorte Entre 1986 e 2004	Casos de câncer orofaríngeo	Pacientes reportaram história de doença periodontal (validadas por aferição de perda óssea radiográfica) e perda dentária.	Não houve aumento significativo de risco de câncer orofaríngeo relacionado ao histórico de doença periodontal ou perda dentária.	Fumo, álcool, idade, tempo, etnia, índice de massa corporal, atividade física, histórico de diabetes, região geográfica, altura, escore de vitamina D e consumo de cálcio, vegetais, carne vermelha, frutas e calorias totais.
Tezal et al. 2009 Estados Unidos	473 pacientes	Caso-controle	Pacientes diagnosticados no Rosswel Park Center Institute (1999-2005)	Perda óssea alveolar analisada em radiografias panorâmicas	Cada mm de perda óssea alveolar associado com aumento de risco de câncer de cabeça e pescoço (OR 4,36), sendo o poder de associação maior para a cavidade bucal, mesmo ajustado para uso de tabaco e álcool. Pacientes com periodontite apresentavam menor diferenciação de lesões ulceradas de câncer. A periodontite crônica é um fator de risco independente para câncer de cabeça e pescoço e o fumo modifica essa associação.	Fumo, álcool, idade, gênero, raça/etnia, estado civil e número de dentes.

Sharma et al. 2011	20 pacientes com leucoplasia e periodontite pré-existente	Caso-controle	Grau de displasia das lesões de leucoplasia e níveis de IL-6 na saliva	Periodontite crônica através de PS \geq 4mm e PI de acordo com a OMS (1997)	Aumento significativo nos níveis de IL-6 em pacientes com periodontite com e sem leucoplasia comparado ao controle. No grupo com leucoplasia o nível de IL-6 aumentou de acordo com a severidade da displasia. O nível de IL-6 foi maior em fumantes comparado a não fumantes em todos grupos.	Homens e fumo
Índia	20 pacientes com periodontite e sem leucoplasia 20 controles					
Ahn et al. 2012	12505 pacientes, sendo 7852 com resposta imune de Ig G da Porphyromonas Gingivalis	Coorte Fase 1 – 1988 a 1994 Fase 2 – até 2006	Câncer bucal, faringe, esôfago, estômago, pâncreas, fígado e cólon Mortalidade dos cânceres orodigestivo	Periodontite moderada (2 dentes interproximais com PI \geq 6 mm e 1 dente com PS \geq 5mm) e grave (2 dentes interproximais com PI \geq 4 mm e 2 dentes com PS \geq 5mm) Resposta imune de IgG da bactéria Porphyromonas Gingivalis	Periodontite (moderada e grave) foi associada à mortalidade de câncer orodigestivo (OR 2,28), e o índice de mortalidade aumentou com o aumento da severidade da periodontite. Mortalidade de câncer orodigestivo foi relacionada com periodontite e a Porphyromonas gingivalis independente da presença de doença periodontal.	Fumo, gênero, idade, educação, raça e índice de massa corporal
Estados Unidos						
Maruyama et al. 2012	Casos - 25 pacientes com concentração de albumina sérica \geq 3.85 g/dL	Caso-controle	Câncer de cabeça e pescoço Concentração de albumina sérica \geq 3.85 g/dL = normal	PS, PI, índice de placa e de sangramento, número e dentes, mobilidade dentária e oclusão dentária	O grupo de caso tiveram uma maior de PI e uma maior concentração de proteína C reativa comparado com o grupo controle. Não houve diferença estatística nos outros parâmetros periodontais entre os grupos Um modelo de regressão logística mostrou que a média de PI foi significativamente associada com altos ou baixos níveis de concentração de albumina sérica	Fumo, álcool, índice de massa corporal, gênero e estágio do câncer
Japão	Controle – 25 pacientes \leq 3.85 g/dL		Estágio do câncer			

Meisel et al.	4233 pacientes	Caso-controle	Exame clínico bucal para lesões bucais e leucoplasias	PS, PI, índice de placa, sangramento à sondagem e perda dentária	Aumento da severidade de periodontite aumentou probabilidade de desenvolver leucoplasias (OR ajustado para nível socioeconômico e fumo para o segundo, terceiro e quarto quartil de PI 1,7; 3,3 e 5,3 respectivamente); OR para PS 2,0; 2,9 e 3,8 respectivamente.	Fumo, fatores socioeconômicos e higiene bucal.
2012						
Alemanha						
Ansai et al.	656 pacientes com 80 anos	Coorte	Câncer orodigestivo	Perda dentária	Ajustando para os fatores de risco, a perda dentária esteve significativamente associado com o risco de morte por câncer orodigestivo	Fumo, álcool, gênero, idade, educação, residência e índice de massa corporal
2013		Entre 1998 a 2010	Mortalidade			
Japão						
Eliot et al.	513 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	Caso-controle	Câncer bucal, faringe e laringe	Doença periodontal autoreportada e uso de colutórios bucais	Doença periodontal teve levemente associado a câncer de cabeça e pescoço (OR 1,09), sendo câncer de boca de OR 1,07	Fumo, álcool, gênero, idade e educação
2013	567 controles					
Estados Unidos						

Legenda: OR - Odds Ratio; PI - Perda de inserção clínica; PS - Profundidade e sondagem; mm - milímetros; CPI - Índice periodontal comunitário; CPOD - Dentes cariados, perdidos e obturados; IL - interleucina; OMS – Organização mundial da saúde; Ig - Imunoglobulinas; g - Gramas; dL – Decilitro.

Segundo uma revisão de literatura associando o câncer bucal com doença periodontal, as infecções bucais podem causar uma transformação maligna nos tecidos bucais e de outros órgãos (MEURMAN e BASCONES-MARTINEZ, 2011). O mecanismo proposto para o processo envolvendo as infecções localizadas e o câncer se dá pela seguinte sequência: (a) alteração fisiológica do hospedeiro, como a inflamação, causada pelas bactérias; (b) modificação da linfoproliferação de anticorpos pela influência da infecção; (c) aumento da proliferação de células epiteliais causado pelo desequilíbrio hormonal; (d) efeito direto na transformação celular; (e) produção de metabólitos tóxicos e carcinogênicos pelas bactérias (CHANG e PARSONNET, 2010). Foi proposto que a doença periodontal poderia influenciar na carcinogênese bucal de duas maneiras: direta e indireta (Figura 1) (GONDIVKAR et al., 2013).

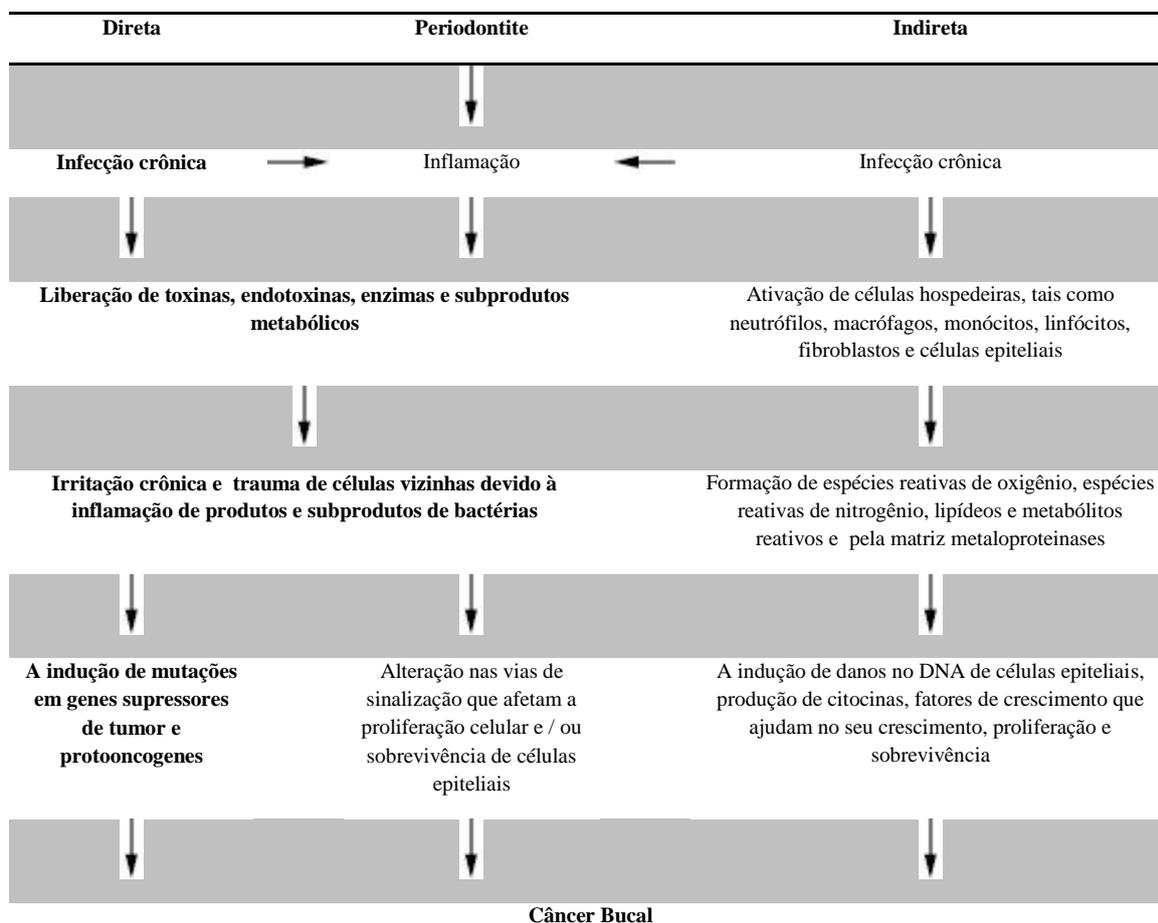


Figura 1 - Possível mecanismo sugerindo a correlação entre periodontite e câncer bucal. Adaptado de GONDIVKAR, S. M. et al. Chronic periodontitis and the risk of head and neck squamous cell carcinoma: facts and figures. *Exp Oncol*, v. 35, n. 3, p. 163-7, 2013.

Diretamente seria pelo efeito tóxico das bactérias e seus produtos, tais como endotoxinas (lipopolissacarídeos), enzimas (proteases, collagenases, fibrinolisinase, e fosfolipase D) e subprodutos metabólicos (sulfureto de hidrogênio, amônia, e os ácidos graxos), que são tóxicos para as células circundantes e pode induzir diretamente mutações em genes supressores de tumor e proto-oncogenes ou alterar as vias de sinalização que afetam a proliferação celular e / ou sobrevivência de células epiteliais (TEZAL, GROSSI, GENCO, 2005). Um estudo de coorte recente apontou que indivíduos têm mais de duas vezes mais chances de morte por câncer orodigestivo quando apresentam periodontite (moderada ou grave), aumentando de acordo com a gravidade da doença periodontal. Além disso, os autores também observaram a presença da bactéria *Porphyromonas gingivalis* (específica da doença periodontal) em níveis de anticorpos séricos relacionados a mortalidade de câncer orodigestivo, independente se a doença periodontal estava presente (AHN, SEGERS, HAYES, 2012).

Indiretamente, seria por um processo inflamatório onde as bactérias bucais e seus produtos ativam as células hospedeiras locais, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células epiteliais. A partir dessa ativação, uma série de eventos ocorre, podendo o que pode induzir danos no DNA das células epiteliais. Também, a produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros sinais que fornecem um ambiente para a sobrevivência celular, a proliferação, a migração, angiogênese e a inibição da apoptose (COUSSENS e WERB, 2002; MOUTSOPOULOS e MADIANOS, 2006). Este ambiente pode ajudar as células epiteliais a acumular mutações e conduzir essas células epiteliais mutantes a proliferar, migrar e dar-lhes uma vantagem de crescimento (GONDIVKAR et al., 2013)

1.4 DOENÇA PERIODONTAL EM MODELOS ANIMAIS

Modelos animais permitem muitas vezes uma análise mais definitiva da relação de causa e efeito do que os estudos clínicos em humanos (GRAVES et al., 2012). Os modelos animais, especialmente os ratos, têm características úteis para investigar os mecanismos envolvidos na patogênese da doença periodontal e proporcionam a oportunidade de investigar os passos discretos da doença periodontal (FERNANDES et al., 2007; GRAVES et al., 2008). Um dos métodos de indução de doença periodontal em ratos mais utilizados é por meio de ligaduras, porque similarmente a humanos, este

método leva ao acúmulo de placa dentária e consequente microulceração do epitélio sulcular, que, por sua vez, facilita a invasão de agentes patogênicos periodontais no tecido conjuntivo, e, conseqüentemente, pode levar a perda do osso alveolar em um período previsível de até sete dias (BEZERRA et al., 2000; GRAVES et al., 2008).

A análise da perda óssea alveolar em ratos Wistar através da análise morfológica foi descrita e aparenta ser um método bem estabelecido e que apresenta alta concordância com métodos como o histológico e por microtomografia computadorizada (FERNANDES et al., 2007; GUHA et al., 2007; LIBERMAN et al., 2011). Esse método foi proposto para medir alterações na altura óssea alveolar por uma linha vertical entre a junção amelocementária e a crista óssea na região de molares (RIVALDO, PADILHA, HUGO, 2005). O referido método linear é viável e não aparenta apresentar diferença em relação a outros métodos para quantificar morfolologicamente a perda óssea alveolar de molares em ratos Wistar, tanto na sua face palatina quanto na face vestibular (LIBERMAN et al., 2011; AZAMBUJA et al., 2012).

1.5 CARCINOGENESE BUCAL COM O USO DE 4NQO EM MODELOS ANIMAIS

Carcinogênese é um processo de vários estágios em que as células epiteliais progridem por uma série de fenótipos pré-malignos até que as células normais se transformem em câncer (VINCENT e GATENBY, 2008). A carcinogênese em animais permite um melhor entendimento nas mudanças celulares e moleculares associadas com a iniciação e progressão do câncer bucal em humanos desde as alterações normais às patológicas e é capaz de serem analisadas através de técnicas histopatológicas, genéticas e bioquímicas (RIVERA et al., 2011). Além disso, permitem o desenvolvimento e testes de novas abordagens para a prevenção e tratamento de doenças, a identificação precoce de marcadores de diagnóstico e novos alvos terapêuticos, e, uma melhor compreensão da biologia e da genética dos diferentes estágios de iniciação, promoção, progressão e metástase *in vivo* (RIVERA, 2012).

O estágio de iniciação ocorre quando as células sofrem o efeito dos agentes carcinogênicos que provocam modificação nos genes. O estágio de promoção corresponde ao momento em que as células iniciadas sofrem o efeito dos agentes carcinogênicos, classificados como oncopromotores sendo transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. O terceiro estágio é o de progressão, que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas onde o câncer já está estabelecido e evoluindo até os primeiros sinais clínicos da doença (VINCENT e GATENBY, 2008).

O modelo de carcinogênese química parece ser o principal meio de indução de câncer em animais, pois a identificação dos químicos constituintes no álcool e no tabaco parecem ser os principais responsáveis pela maioria dos carcinomas epidermóide em humanos (MOGNETTI, DI CARLO, BERTA, 2006). O agente alquilante 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) parece ser o carcinógeno químico mais adotado, pois constitui um método experimental de carcinogênese da mucosa bucal que reproduz a sequência dos estágios de hiperplasia, displasia, displasia severa e carcinoma *in situ* de maneira semelhante àquela da cavidade bucal de seres humanos (KANOJIA e VAIDYA, 2006; RIBEIRO e SALVADORI, 2007).

A utilização de ratos Wistar parece ser um modelo apropriado para a indução de carcinoma epidermóide bucal através do 4NQO, porque estes apresentam a mucosa bucal, principalmente da língua e do palato, muito parecida com a de humanos e são de fácil manuseio e aquisição (NAUTA et al., 1996; EL-ROUBY, 2011). Uma vantagem do 4NQO é que ele produz uma carcinogênese em língua em ratos, muito similar à de humanos, e que pode ser diluído em baixas concentrações na água em longo prazo reduzindo as chances de contaminação, risco de acidentes de manipulação dos animais e outros efeitos adversos (TANG et al., 2004; VERED, YAROM, DAYAN, 2005).

Resumidamente, o mecanismo de ação cancerígena do 4NQO é através da geração de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, tais como os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, que induzem o estresse oxidativo intracelular (NUNOSHIBA e DEMPLÉ, 1993). As espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio causam danos diretos e indiretos às macromoléculas, incluindo o DNA, predominantemente, pela ligação de resíduos da guanina, resultando em adutos

(KANOJIA e VAIDYA, 2006). Estes danos causados pelo 4NQO são semelhantes aos carcinógenos presente no tabaco (RIVERA, 2012).

Um protocolo foi proposto onde a ingestão de 50 ppm de 4NQO diluído em água por um período de 20 semanas é o suficiente para o aparecimento de carcinoma epidermóide em língua de ratos Wistar, e isso foi confirmado tanto do ponto de vista macroscópico (clínico) quanto microscópico (histopatológico) quando se obteve uma ocorrência de 70% de carcinoma epidermóide e 30% de displasia nas línguas dos ratos (RIBEIRO e SALVADORI, 2007). Os resultados utilizando este protocolo claramente demonstraram que alterações histopatológicas na mucosa da língua ao longo experimento ao longo das 20 semanas desde um epitélio normal, hiperqueratose, displasia premalignas e carcinoma *in situ* para um carcinoma epidermóide (RIBEIRO et al., 2004).

Tendo em vista o exposto, verifica-se que a ocorrência de câncer pode ser de alguma maneira influenciada pela presença de infecções crônicas. Sendo a doença periodontal uma infecção crônica, com impacto local e geral, é lícito supor que haja uma possível relação entre as duas patologias no plano da cadeia causal. Nesse sentido, estudos que testem essas eventuais hipóteses, geradas a partir da associação epidemiológica e embasada em mecanismos indiretos estudados em outros modelos, é importante que estudos experimentais em animais sejam realizados. Saliente-se que, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos publicados sobre essa temática.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem por objetivo analisar o efeito da presença de doença periodontal induzida por ligadura e o desenvolvimento experimental de câncer de língua em ratos Wistar.

3 HIPÓTESE

O presente estudo foi realizado tendo por hipótese experimental que a presença de inflamação periodontal modula o desenvolvimento de lesões de câncer em ratos.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, controlado em modelo animal. A Figura 2 demonstra esquematicamente o desenho experimental do estudo.

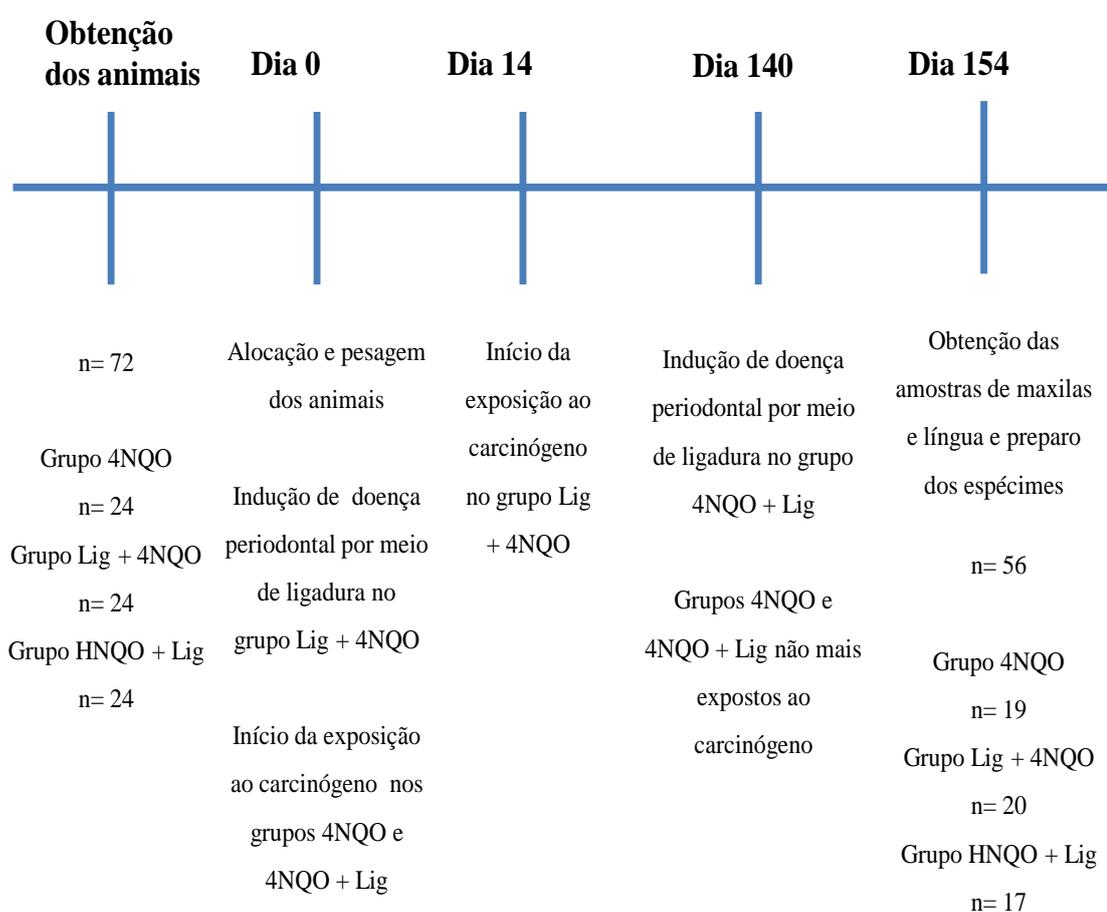


Figura 2 – Desenho do Estudo

Grupo 4NQO, com exposição ao carcinógeno por 140 dias e ausência de indução de doença periodontal; Grupo Ligadura + 4NQO, indução de doença periodontal e após 14 dias exposição ao 4NQO por 140 dias; Grupo 4NQO + Ligadura, exposição ao 4NQO por 140 dias e após indução de doença periodontal por 14 dias;

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos propostos por esse projeto obedeceram a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais (GOLDIM e RAYMUNDO, 1997). A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) com protocolo 22959 (anexo A).

4.3. MODELO ANIMAL

Foram utilizados para o experimento 72 ratos Wistar machos com idade de 60 dias, pesando aproximadamente 250 g provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas de polipropileno medindo 65 x 25 x 15 cm (5 animais em cada) com o assoalho recoberto de maravalha. Os ratos receberam ração balanceada para roedores e água *ad libitum* com ou sem o carcinógeno 4NQO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro e em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.4. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

4.4.1 Cálculo Amostral

O presente estudo utilizou a perda óssea alveolar como desfecho principal, uma vez que parece não existir trabalhos experimentais sobre a possível associação entre câncer e periodontite. Assim, utilizou-se como referência para o cálculo de tamanho amostral o estudo de Cavagni, et al. (2005) que observou diferença significativa na perda óssea alveolar entre os grupos experimentais. Além disso, salienta-se que o mesmo utilizou metodologia idêntica de avaliação da destruição óssea. Para tal cálculo,

utilizou-se a diferença de perda óssea alveolar entre os grupos, representada pelo valor médio de 0,13mm e desvio-padrão de 0,12. Assumindo um poder de estudo de 0,80 e um erro alpha de 0,05, a amostra estimada foi de 16 ratos por grupo experimental. Sabendo-se que aproximadamente 70% dos ratos desenvolve câncer de língua após 140 dias de acordo com Ribeiro e Salvadori (2007), assim como contabilizando possível taxa de atrição, estimou-se para o presente estudo o acréscimo de 50% de ratos na amostra dos grupos submetidos a carcinogênese, ou seja, 24 ratos por grupo.

4.4.2 Constituição dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais da seguinte maneira:

Grupo 4NQO: exposição ao 4NQO, conforme descrito no item 4.5.1 e ausência de indução de doença periodontal (n=24);

Grupo Ligadura + 4NQO: realizou-se a indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura, conforme descrito no item 4.5.2. e, após 14 dias, iniciou-se a exposição ao 4NQO, conforme descrito nos itens 4.5.1 (n=24);

Grupo 4NQO + Ligadura: exposição ao 4NQO, conforme descrito no item 4.5.1 e, após 140 dias indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura por 14 dias, conforme descrito no item 4.5.2 (n=24).

4.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Exposição ao 4NQO

Inicialmente, o carcinógeno 4NQO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em água filtrada até atingir 50ppm. Obteve-se esta concentração através de 50mg de 4NQO em pó, que foi medido através de uma balança eletrônica de alta precisão, a adição do solvente dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluídos em um litro de água filtrada. As soluções foram preparadas semanalmente e armazenadas em frascos âmbar devidamente identificados devido à possível fotólise e periculosidade do carcinógeno (conforme orientações do fabricante na bula do produto). O 4NQO que foi substituído três vezes por semana. Sendo o 4NQO uma substância carcinógena de relevante periculosidade para humanos, o preparo da solução, obedeceu o protocolo de

proteção descrito no item . e utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) específicos conforme indicação do fabricante do produto (Sigma, St. Louis, MO, EUA):

- Uso de óculos de proteção;
- Luvas reforçadas;
- Máscara com filtro de proteção tipo P2 (EN143).

A exposição ao 4NQO durou 140 dias, conforme estudo prévio (RIBEIRO e SALVADORI, 2007).

4.5.2. Indução de Perda Óssea Alveolar

A doença periodontal foi induzida por meio de colocação de ligadura no segundo molar superior de uma hemiarcada do rato (lado direito). A colocação da ligadura foi realizada mediante anestesia geral, sob supervisão de um médico-veterinário. Todos os grupos que não receberam a ligadura foram também anestesiados em todos os momentos para controle do viés de estresse. O protocolo anestésico utilizado foi composto por um fármaco dissociativo – Cloridrato de Cetamina 5% (80 mg/Kg) - Cetamin® administrado concomitante a um fármaco miorelaxante - xilazina 2% (0,8 mg/Kg) - Dopaser®. Os dois fármacos na concentração anteriormente citada foram misturados na proporção de 1:1 (mL) em uma mesma seringa. Uma concentração de 0,2 ml/100g de peso do animal desta mistura foi administrada por via intra-peritoneal (IP) promovendo, assim, anestesia geral. O fio de seda (4-0) - Ethicon® - foi colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais e realizado um nó na face vestibular. Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram a metodologia publicada por Sallay, et al. (1982) e Galvão, et al (2003).

4.5.3 Peso dos Animais

Para a pesagem dos animais foi utilizada balança eletrônica e os dados foram expressos em grama (g) de peso corporal a cada 4 semanas.

4.5.4 Morte dos Animais

Os animais foram mortos após decorridos 154 dias do início da fase experimental, conforme explicitado na Figura 2. A morte dos animais foi realizada por

decapitação, 24 horas após a última avaliação *in vivo*. Este método foi utilizado com o intuito de permitir a coleta de maiores volumes de sangue para as análises sorológicas futuras do projeto. Após a remoção dos tecidos e órgão para posterior análise, o restante do material biológico foi encaminhado para descarte apropriado junto ao biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, conforme descrito no item 4.6.2.

4.5.5 Obtenção das Peças Maxilares

As maxilas dos animais foram removidas com auxílio de cinzéis e armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%, devidamente etiquetados com o número do animal e grupo ao qual pertencia. As maxilas foram imersas em hipoclorito de sódio a uma concentração de 9% de cloro ativo, durante cinco horas e os tecidos moles mecanicamente removidos. Passado este período, as peças foram lavadas e secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, os dentes foram corados com azul de metileno a 1% durante um minuto, lavando-se e secando-se novamente para remover excessos da solução.

4.5.6 Análise Morfométrica da Destruição Óssea Alveolar

Os procedimentos de preparo das peças bem como de análise morfométrica seguiram a metodologia proposta por Fernandes, et al. (2007) e foram realizados no Laboratório de Periodontia Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a tomada das fotografias, foi utilizada uma câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que o cone fique o mais paralelo possível em relação ao solo.

Foi confeccionado um aparato utilizando pasta pesada de Silicona de Adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera utilidade, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo. Foram realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das peças (hemimaxilas) sendo que a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea foi feita através programa Image Tool 3.0, por um examinador calibrado e que desconhecia a que grupo experimental

pertenciam os espécimes. Para avaliação da calibragem intra-examinador, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos para serem duplamente mensurados, com uma semana de intervalo. Para fins de comparação da perda óssea foram feitas dez medidas lineares (perpendiculares ao solo) da junção amelo-cementária à crista óssea, sendo cinco por vestibular e cinco por palatino. Para cada face, foram feitas duas medidas na raiz mesial, duas na distal e uma na região de furca. A perda óssea dos dentes foi gerada a partir da média dessas dez medidas lineares.

4.5.7 Análise Macroscópica e Histológica das Línguas

Imagens macroscópicas foram realizadas através da utilização de máquina fotográfica para ilustrar as diferentes graus de alterações de língua nos diferentes grupos.

Os fragmentos de língua foram fixados em formalina tamponada 10% e submetidos ao processamento histopatológico, seguindo o seguinte protocolo: desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol, inclusão em paraplast (sigma) seguindo orientação do longo eixo da língua e corte em micrótomo (4µm). Após, os cortes foram desparafinados, reidratados, submetidos a coloração por Hematoxilina & Eosina (HE) e montados em resina para análise microscópica.

Após a análise histológica, as displasias foram classificadas em diferentes graus: leve (DEL), moderada (DEM), severa (DES) e Carcinoma *in situ* como descrito no Quadro 2 (LUMERMAN, FREEDMAN, KERPEL, 1995).

Quadro 2 – Classificação das displasias estabelecida por Lumerman, Freedman e Kerpel (1995)

Classificação Histológica das Displasias	Descrição
DEL	Alterações mínimas confinadas no terço inferior do epitélio
DEM	Alterações comprometendo até 2/3 do tecido epitelial
DES	Alterações comprometendo mais que 2/3 sem envolver todo epitélio
Ca <i>in situ</i>	Alteração em todo o epitélio e células

	apresentando hipercromatismo nuclear, aumento do núcleo, mitoses típicas e atípicas e ausência de invasão tecidual.
--	---

A classificação dos carcinomas epidermóides foi realizada de acordo com a gradação histopatológica estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no qual estão classificadas em três categorias: células escamosas pouco, moderadamente e bem diferenciadas como descrito no Quadro 3 (BARNES, 2005). A arquitetura tecidual das células escamosas bem diferenciadas assemelha-se a um padrão normal do epitélio, por outro lado, as células escamosas pouco diferenciadas caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, muitas mitoses típicas e atípicas e pouca ceratinização.

Quadro 3 – Classificação recomendada pela Organização Mundial da Saúde (2005)

Gradação Histopatológica – OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Várias mitoses típicas e atípicas Pouco ceratinização
Moderadamente diferenciadas	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão do epitélio escamoso

4.6 CUIDADOS PARA A PROTEÇÃO DO PESQUISADOR

Foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório.

4.6.1 Manuseio de Reagentes e Solventes

- os reagentes foram utilizados mediante solicitação ao pesquisador responsável ou ao responsável técnico do laboratório;

- o pesquisador tinha conhecimento dos métodos e o grau de periculosidade de todos os reagentes manipulados no laboratório;
- utilizou-se sempre jaleco e luvas para a manipulação dos reagentes;
- transportou-se com segurança os frascos de reagentes e solventes, utilizando sempre em bandejas;
- manuseou-se cuidadosamente os frascos de reagentes e solventes;
- usou-se óculos de proteção e capela de exaustão para as operações com produtos tóxicos e voláteis;
- usou-se rótulos de identificação em todos os frascos de reagentes e de amostras estocados: 1) nome da substância estocada, 2) concentração, 3) data de preparo, 4) nome do pesquisador que preparou;
- frascos não rotulados foram descartados;
- verificou-se os prazos de validade das soluções e encaminhadas as vencidas para o descarte.

4.6.2 Procedimentos de Descarte dos Materiais Biológico, Cortante e Tóxicos.

Os resíduos em geral foram segregados e adequados aos coletores próprios. O descarte de resíduos químicos foi feito seguindo as normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGR). Os mesmos foram gerados de forma segura, sendo coletados, acondicionados, identificados e transportados conforme normas da COSAT (Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho), que prevêem recipientes apropriados para descartes, identificados pela data inicial do envase, pH final, laboratório de origem, nome dos responsáveis legal, tipo de resíduo químico sólido ou líquido, assim como a descrição de sua constituição. Os materiais recolhidos foram encaminhados ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que destina os resíduos para descarte ou reciclagem dos materiais.

Os restos dos animais de experimentação foram acondicionados em plásticos brancos identificados e armazenados em freezer a -20°C específico da Unidade de

Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, até o recolhimento semanal pelo setor de coleta especial para animais do DMLU.

As seringas e agulhas foram armazenadas em caixas específicas, adequadas para material cortante, identificadas e pertencentes a da Unidade de Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para posterior recolhimento quinzenal pelo setor de coleta especial do DMLU. Os rejeitos tóxicos foram separados em locais específicos e adequados para posterior recolhimento quinzenal pelo setor de coleta especial do DMLU.

5 CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO

5.1 CEGAMENTO

O cegamento dos pesquisadores aconteceu no momento da análise morfológica e histopatológica. As peças/lâminas foram codificadas, por um examinador externo ao estudo e (sorteadas por um programa de computador) nomeadas de acordo com esse código, de modo que o examinador que fez a análise das fotografias/lâminas não sabia a que grupo cada espécime pertencia.

5.2 REPRODUTIBILIDADE

Durante o estudo, cerca de 10% dos espécimes foram aleatoriamente escolhidos (por sorteio) para serem duplamente mensurados, em termos de perda óssea alveolar, sendo comparados através do Coeficiente de Correlação Intraclasse, o qual apresentou resultado excelente (0,96).

Para a análise histopatológica a reprodutibilidade intra examinador foi realizada reavaliando 1 lâmina a cada 10 analisadas por dois patologistas experientes (Alessandro Menna e Grasieli Ramos). O Coeficiente de Correlação Intraclasse, foi de 0,93 e o coeficiente Kappa foi de 0,75.

6 ANÁLISE DOS DADOS

6.1 HIPÓTESE ESTATÍSTICA

A hipótese de nulidade a ser testada estatisticamente é a de que não existe nenhuma diferença entre os grupos experimentais para os desfechos primários e secundários. A hipótese experimental é de que pelo menos um dos grupos é estatisticamente diferente dos demais.

6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis do presente estudo foram testadas quanto a normalidade. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico STATA™ versão 10.1. O peso corporal foi analisado através de ganho percentual médio em relação ao peso basal nos dias 28, 56, 84, 112 e 140. Médias e erros-padrão foram calculados e analisados entre os grupos através de ANOVA. Os resultados da perda óssea alveolar estão expressos em mediana e intervalos interquartis (25 e 75%), tendo em vista sua distribuição não-simétrica. Para realizar a comparação entre os grupos quanto a perda óssea, nos diferentes momentos analisados, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Para a análise da associação existente entre a doença periodontal induzida por ligadura e a ocorrência de lesões histopatológicas das línguas foi utilizado o teste exato de Fisher com posterior análise para resíduos ajustados. No presente estudo o animal foi a unidade de análise e adotou-se um erro alfa de 5%.

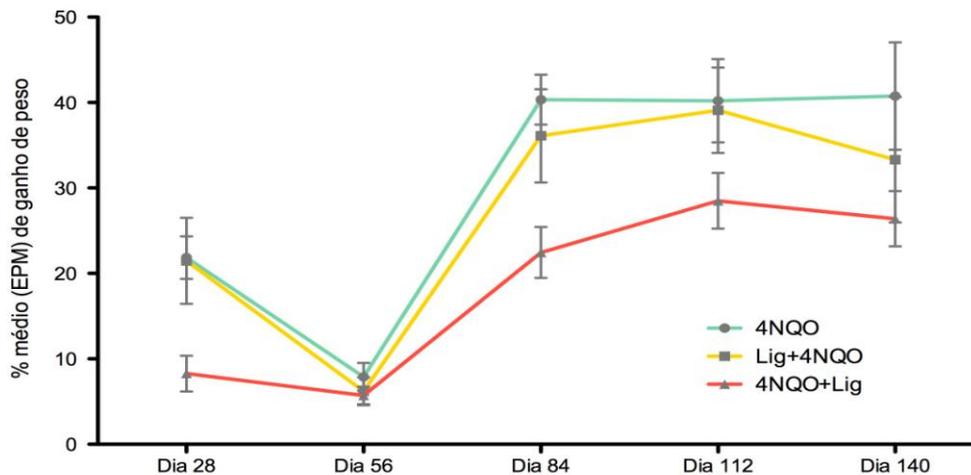
7 RESULTADOS

Dos 72 animais inicialmente participantes do estudo, 56 completaram o período experimental. Durante o experimento, morreram 5, 4 e 7 animais dos grupos 4NQO, Ligadura+4NQO e 4NQO+Ligadura, respectivamente. Assim, a análise do presente estudo contempla 19, 20 e 17 animais dos referidos grupos. As mortes aconteceram em virtude da exposição ao carcinógeno e intercorrências anestésicas.

O Gráfico 1 demonstra o percentual médio de ganho de peso dos grupos ao longo do experimento, em relação ao peso basal. Foram observadas diferenças

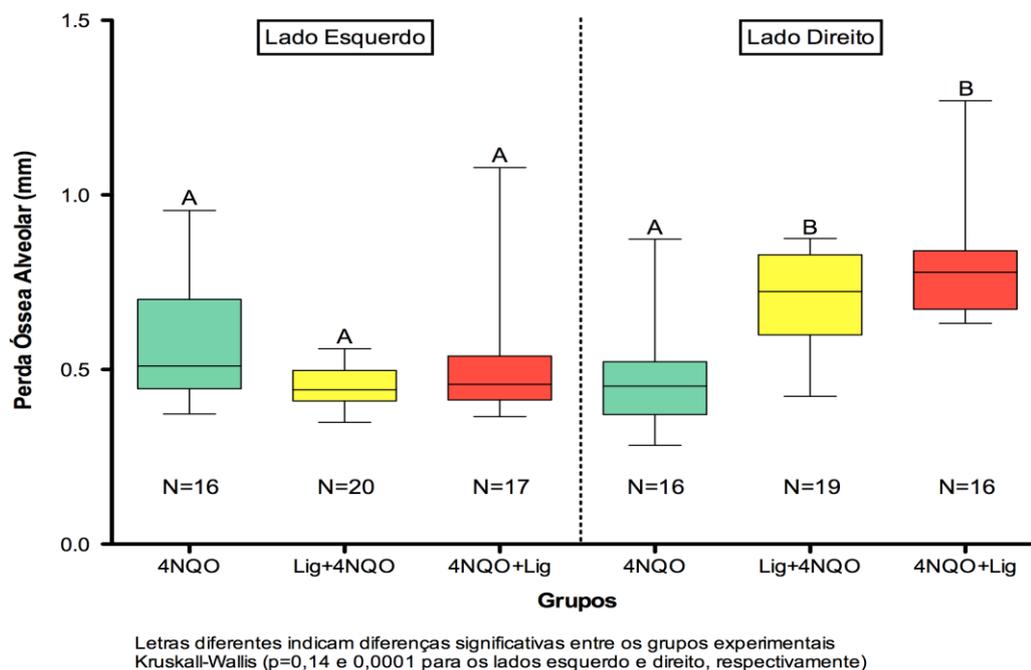
estatisticamente significativas no percentual médio de ganho de peso nos dias 28 e 84. As análises realizadas nos dias 56, 112 e 140 não revelaram diferenças de ganhos de peso estatisticamente significativas.

Gráfico 1: Percentual médio de ganho de peso (EPM) dos grupos ao longo do experimento, em relação ao peso basal.



O Gráfico 2 demonstra a perda óssea alveolar nos três grupos, nos lados com e sem ligadura. Observa-se que não houve diferenças estatisticamente significativas na perda óssea alveolar no lado que não recebeu colocação de ligaduras. No lado com ligaduras, observou-se uma maior perda óssea nos grupos a elas expostos, sem diferenças entre si. A perda óssea no grupo somente exposto ao 4NQO foi menor ($p < 0,05$).

Gráfico 2: Mediana (percentil 25 e 75) da Perda Óssea Alveolar (mm) nos lados com e sem ligadura de acordo com os diferentes grupos experimentais.



O anexo B ilustra as diferentes alterações macroscópicas das línguas encontradas nos diferentes grupos experimentais.

O Quadro 4 demonstra a distribuição de ocorrência dos diferentes diagnósticos histopatológicos, de acordo com os grupos experimentais. Observa-se que todos os animais apresentaram alterações proliferativas na língua, sendo que displasias apresentaram ocorrência bastante baixa e hiperplasias aconteceram em 15% dos animais do grupo Ligadura+4NQO. No que diz respeito a diagnóstico de carcinoma *in situ*, este foi presente em 15,8%, 35% e 17,6% dos grupos expostos ao 4NQO, ligadura+4NQO e 4NQO+ligadura, respectivamente. Os diagnósticos de carcinoma apresentados distribuíram-se nas categorias moderadamente e bem diferenciados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na ocorrência de carcinomas moderadamente diferenciados entre os grupos. Em relação ao diagnóstico de carcinoma bem diferenciado, observou-se uma menor ocorrência nos animais que apresentavam, desde o início da exposição ao carcinógeno, a presença de inflamação periodontal ($p<0,05$). A inserção de ligadura após um período de 140 dias de exposição ao carcinógeno não influenciou a ocorrência de carcinoma bem diferenciado. O anexo B demonstra fotomicrografias de diferentes diagnósticos histopatológicos encontrados no presente estudo.

Quadro 4 - Ocorrência de diferentes diagnósticos histopatológicos segundo o grupo experimental.

Grupo	n	Sem alteração n(%)	Hiperplasia n(%)	Displasia leve n(%)	Displasia moderada n(%)	Displasia severa n(%)	Carcinoma <i>in situ</i> n(%)	Carcinoma levemente diferenciado n(%)	Carcinoma moderadamente diferenciado n(%)	Carcinoma bem diferenciado n(%)
4NQO	19	0(0)	0(0)	0(0)	1(5,3)	1(5,3)	3(15,8)	0(0)	1(5,3)	13(68,4)
Ligadura + 4NQO	20	0(0)	3(15)	1(5)	0(0)	0(0)	7(35)	0(0)	3(15)	6(30) *
4NQO + Ligadura	17	0(0)	0(0)	1(5,9)	0(0)	0(0)	3(17,6)	0(0)	3(17,6)	10(58,8)

*Teste Exato de Fisher, complementado por análise dos resíduos ajustados, $p=0,038$ em relação ao grupo 4NQO.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o eventual impacto da presença de inflamação periodontal sobre o processo de carcinogênese induzida em ratos Wistar. Para tanto, um estudo experimental em modelo animal foi realizado, com indução de inflamação periodontal e exposição a um carcinógeno, com o objetivo de estimular a carcinogênese na língua. A literatura apontando para uma associação positiva entre câncer bucal e doença periodontal é crescente (FITZPATRICK e KATZ, 2010). Tezal, Grossi e Genco (2005) sugeriram uma correlação positiva entre o histórico de doença periodontal e a progressão dos tumores na cavidade bucal. Entretanto, a maioria dos estudos que avaliam esta relação é do tipo caso-controle (TALAMINI et al., 2000; ROSENQUIST et al., 2005; GUHA et al., 2007; TEZAL et al., 2007; MICHAUD et al., 2008; REZENDE et al., 2008; TEZAL et al., 2009; SHARMA et al., 2011; AHN et al., 2012; MARUYAMA et al., 2012; MEISEL et al., 2012; ELIOT et al., 2013) .

Para colocar os resultados encontrados nesse estudo em perspectiva, é importante que se contextualize o modelo utilizado. Primeiramente, o método de indução de doença periodontal através da colocação de ligadura é um método que leva ao acúmulo de biofilme similar a humanos e consequente microulceração do epitélio sulcular, que, por sua vez, facilita a invasão de agentes patogênicos periodontais no tecido conjuntivo, e, conseqüentemente, pode levar a perda do osso alveolar (GRAVES et al., 2008). No contexto dos resultados observados, quando se compara a perda óssea alveolar ocorrida nos três grupos, no lado esquerdo, onde somente a perda óssea de ocorrência natural é observada, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Ao se comparar os resultados obtidos no lado com colocação de ligaduras, observou-se uma maior perda óssea nos grupos a elas expostos, sem diferenças entre si. Esses achados demonstram que a indução de doença periodontal foi eficiente como demonstrado em outros estudos (LIBERMAN et al., 2011; AZAMBUJA et al., 2012). Assim, pode-se inferir, para fins contextuais do presente estudo que os grupos que receberam colocação de ligaduras apresentaram um desafio inflamatório maior.

A indução experimental da carcinogênese também tem papel crucial no contexto do presente estudo. O agente 4QNO parece ser o carcinógeno químico mais adotado para indução de câncer lingual em ratos, constituindo-se em um método experimental de carcinogênese da mucosa bucal que reproduz a sequência dos estágios de hiperplasia, displasia, displasia severa e carcinoma *in situ* de maneira muito semelhante àquela da cavidade bucal de seres humanos (KANOJIA e VAIDYA, 2006; RIBEIRO e SALVADORI, 2007).

Entretanto, é lícito compreender que a utilização de um agente químico de indução de carcinogênese possa ter um papel importante na saúde geral dos animais em estudo. Do total de 72 animais que foram expostos ao 4NQO, 16 animais (22%) morreram durante o experimento, o que corrobora dados da literatura que relatam morbidade elevada relativa à exposição ao 4NQO (RIBEIRO e SALVADORI, 2007). Durante o experimento, foram observadas características de caquexia dos animais, especialmente levando-se em consideração longo período de 140 dias de exposição ao carcinógeno.

Quanto ao peso dos ratos, que poderia ser um *proxy* de saúde geral, o comportamento não permitiu inferir claras tendências de diferenças entre os animais em estudo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas no percentual médio de ganho de peso nos dias 28 e 84 quando os grupos são comparados. As análises realizadas nos dias 56, 112 e 140 não revelaram diferenças de ganhos de peso estatisticamente significativas. Assim, as diferenças no ganho de peso corporal foram observadas em 2 dos 5 momentos analisados, sem permitir observação de um padrão. Isso pode ser explicado pela sazonalidade da avaliação do peso corporal e, principalmente pelo fato que todos os animais em estudo foram expostos ao carcinógeno. Saliente-se que nas duas avaliações finais do estudo, não foram observadas diferenças. Esse dado permite supor que os procedimentos experimentais não geraram alterações de saúde sistêmica diferenciadas entre os grupos, reforçando a validade dos achados do desfecho principal.

No contexto da qualidade dos dados do estudo, é importante ressaltar que o exame de todos os desfechos do estudo foi realizado por examinador treinado e desconhecedor do grupo em análise, de acordo com os paradigmas da pesquisa contemporânea.

O desfecho principal do presente estudo foi o diagnóstico histopatológico das línguas dos animais. Para o reconhecimento e classificação histológicos das displasias, foram utilizados os critérios estabelecidos para avaliação de displasia epitelial em lesões cancerizáveis de acordo com Warnakulasuriya, et al. (2008) e classificadas em diferentes graus: leve (DEL), moderada (DEM), severa (DES) e Carcinoma *in situ* de acordo com Lumerman, Freedman e Kerpel (1995). A classificação dos carcinomas epidermóides foi realizada de acordo com a gradação histopatológica estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no qual são classificadas em três categorias: células escamosas pouco, moderadamente e bem diferenciadas (BARNES, 2005).

No presente trabalho, observou-se que a exposição ao 4NQO atingiu seus objetivos, permitindo observação de diferentes estágios da carcinogênese de língua no grupo em que foi exposto somente exposto ao carcinógeno com a ocorrência de 5,3% de displasia moderada, 5,3% de displasia severa, 15,8% de carcinoma *in situ*, 5,3% de carcinoma moderadamente diferenciado e 68,4% de carcinoma bem diferenciado o que está de acordo com outros estudos que utilizaram o mesmo protocolo experimental e tiveram uma ocorrência similar de 30% de displasia e 70% de carcinoma (RIBEIRO e SALVADORI, 2007; MIRANDA et al., 2011). Nesse sentido, infere-se, pela análise deste grupo, que o processo experimental de indução de carcinogênese foi efetivo.

A comparação entre os grupos experimentais do presente estudo demonstrou que para os diagnósticos de hiperplasias, displasias e carcinoma *in situ*, não são detectadas diferenças estatisticamente significativas. Da mesma forma, quando se consideram os carcinomas com grau moderado de diferenciação, o comportamento dos grupos não parece diferir. Entretanto, o grupo que apresentava inflamação periodontal antes do início da indução da carcinogênese apresentou um menor grau de lesões de carcinoma bem diferenciado. A indução de doença periodontal após 140 dias de exposição ao 4NQO não parece interferir na carcinogênese. Esses resultados são interessantes, embora tenham sua compreensão como um exercício desafiador. De maneira mais

simplificada pode-se inferir que a presença de somente 14 dias de indução de inflamação periodontal após 140 dias de exposição a um carcinógeno não teve capacidade de alterar, dentro das características metodológicas do presente estudo, os desfechos relativos ao processo de carcinogênese.

Por outro lado, é muito importante que se tenha claro que a inflamação periodontal presente anteriormente ao processo de indução de carcinogênese teve capacidade de modular esse processo, com menor expressão do câncer. De maneira nenhuma pode-se inferir um potencial translacional sugestivo de que a presença de inflamação é um protetor para a carcinogênese. Entretanto, o estudo de eventuais mecanismos responsáveis por esses achados é mandatório.

Algumas hipóteses têm sido propostas para tentar explicar como a doença periodontal poderia influenciar na carcinogênese e duas teorias foram estabelecidas (GONDIVKAR et al., 2013): (1) efeito direto de periodontopatógenos pelo efeito tóxico liberado por endotoxinas, enzimas e subprodutos metabólicos que induziria mutações em genes supressores de tumor e proto-oncogenes ou alterar as vias de sinalização que afetam a proliferação celular e/ou sobrevivência de células epiteliais (TEZAL, GROSSI, GENCO, 2005); (2) efeito indireto por um processo inflamatório: (a) ativação das células hospedeiras locais que geraria através da produção de nitrosaminas a redução bactérias, e, por meio de agentes mutagênicos formado pela interação entre algumas espécies bacterianas e a saliva, tendo a capacidade de desencadear vias mitogênicas e anti-apoptóticas em queratinócitos bucais de espécies reativas de oxigênio (óxidos nítricos), lipídios, metabólitos (malondialdeído e 4 - hidroxil-2nonenal) e matriz de metaloproteinases, o que pode induzir danos no DNA das células epiteliais; (b) produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros sinais que fornecem um ambiente para a sobrevivência celular, a proliferação, a migração, angiogênese e a inibição da apoptose (COUSSENS e WERB, 2002; MOUTSOPOULOS e MADIANOS, 2006). É importante ressaltar que essas possíveis vias de explicação são ainda bastante incipientes tanto no suporte de estudos de qualidade, quanto necessitam amadurecimento com o estudo dos mecanismos envolvidos em diferentes modelos experimentais.

Ainda é sugerido que a doença periodontal indicaria uma deficiência no sistema imune ao combater as bactérias periodontais e subsequentemente deficiente no controle do crescimento de tumores (GONDIVKAR et al., 2013). Foi sugerido, também, por Cugini, et al. (2013) um paralelo entre a doença periodontal e câncer para tentar se entender o desenvolvimento das duas doenças, pois ambas refletem em alterações dependentes da idade na composição e função das comunidades celulares persistentes que evoluem para um ponto de capacidade patogênica que nenhum membro individual demonstraria sozinho. Atualmente, sabe-se que ambas as doenças podem gerar uma resposta imunológica e ter dois caminhos, o pro-inflamatório, que contribui para progressão das doenças, e, o anti-inflamatório, que protege contra a evolução das doenças (PAGE e KORNMAN,1997; ZAMARRON e CHEN,2011). Assim, pode-se, no momento, assumir em eventual papel modulador da inflamação no processo de carcinogênese.

Uma possível explicação adicional para os achados do presente estudo é que as células do sistema imune poderiam inibir o crescimento e a progressão de câncer através do reconhecimento e rejeição de células malignas, fazendo assim uma mudança do estado pró-inflamatório para uma inflamação "latente" ou em um processo de arrumação que suprimiria ativamente a imunidade anti-tumoral (MOTZ e COUKOS, 2011; SCHREIBER, OLD, SMYTH, 2011; CUGINI et al., 2013). Já foram identificadas que as células CD4 e CD8, que são dois tipos de linfócitos T responsáveis por auxiliar no combate de antígenos e na destruição de células infectadas, compreendem a força primária de células do sistema imunológico responsáveis por inibir o crescimento do tumor e desenvolvimento (ZAMARRON e CHEN, 2011). Em um estudo Sheu et al. (1999) apontou que o teste da relação de CD4/CD8 pode ser um indicativo de resposta tumoral pobre no prognóstico de progressão do carcinoma do colo do útero, porém, Silveira et al. (2010) acharam uma alta contagem de CD4 e CD8 em pacientes com carcinoma epidermóide de lábio e de língua, mas não observaram uma associação significativa relacionando-os com a localização do tumor e com metástase.

Outra possível explicação para a menor ocorrência de carcinomas invasivos nos grupos onde foi induzida a doença periodontal previamente é que de alguma forma a resposta imune e inflamatória da doença periodontal pode também ter contribuído na

modulação da carcinogênese. Existe relato na literatura que a doença periodontal poderia passar de um quadro pró-inflamatório para anti-inflamatório (FINE et al., 2009). As bactérias periodontais *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* desencadeiam o antagonismo de citocinas, que, individualmente, poderiam polarizar uma resposta imune para um subconjunto de linfócitos T em particular, e, ao mesmo tempo, elas poderiam promover uma paralisia imunológica (GADDIS, MICHALEK, KATZ, 2011; MYNENI et al., 2011; CUGINI et al., 2013).

Estes achados devem ser observados com cautela, uma vez que as alterações inflamatórias e a resposta imunológica envolvidos em ambas as patologias apresentam inúmeros fatores complexos e distintos uma das outras e que não estão totalmente elucidados.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que a presença do processo inflamatório periodontal tem um potencial de modular a carcinogênese. É importante que se tenha claro que, no momento, a translação desses resultados é impossível. Entretanto, é lícito veicular a informação de que os modelos experimentais do presente estudo envolveram indução de inflamação e de carcinogênese na boca, valorizando a eventual relação entre duas patologias da cavidade bucal. A presença de inflamação periodontal interferiu na carcinogênese e, no momento, pode-se concluir que o processo inflamatório intra-bucal tem potencial de modular a carcinogênese experimental em língua de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

- AHN, J.; SEGERS, S.; HAYES, R. B. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 5, p. 1055-8, May 2012.
- ALLAVENA, P. et al. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 18, n. 1, p. 3-10, Feb 2008.
- ANSAI, T. et al. Association between tooth loss and orodigestive cancer mortality in an 80-year-old community-dwelling Japanese population: a 12-year prospective study. **BMC Public Health**, v. 13, p. 814, 2013.
- AZAMBUJA, C. B. et al. Correlation analysis of alveolar bone loss in buccal/palatal and proximal surfaces in rats. **Braz Oral Res**, v. 26, n. 6, p. 571-7, Nov-Dec 2012.
- BARNES, L. E. A. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, n. Lyon: IARC Press, 2005.
- BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 1009-14, Jun 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 24 de out., 2013.
- BRENER, S. J., FA; BARBOSA, AA; GRANDINETTI, HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.
- BUNDGAARD, T. et al. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. **Cancer Causes Control**, v. 6, n. 1, p. 57-67, Jan 1995.
- CAVAGNI, J. et al. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Braz Oral Res**, v. 19, n. 4, p. 290-4, Oct-Dec 2005.
- CHANG, A. H.; PARSONNET, J. Role of bacteria in oncogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 4, p. 837-57, Oct 2010.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, Dec 19-26 2002.

CUGINI, C. et al. Porphyromonas gingivalis: keeping the pathos out of the biont. **J Oral Microbiol**, v. 5, 2013.

DA SILVEIRA, E. J. et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 1, p. 171-5, Feb 2010.

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**, v. 56, n. 7, p. 664-71, Jul 2011.

ELIOT, M. N. et al. Periodontal disease and mouthwash use are risk factors for head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 7, p. 1315-22, Jul 2013.

ERDEMIR, E. O.; NALCACI, R.; CAGLAYAN, O. Evaluation of systemic markers related to anemia of chronic disease in the peripheral blood of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **Eur J Dent**, v. 2, n. 2, p. 102-9, Apr 2008.

FERNANDES, M. I. et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**, v. 21, n. 3, p. 216-21, Jul-Sep 2007.

FINE, D. H. et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha: a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? **J Periodontol**, v. 80, n. 1, p. 106-13, Jan 2009.

FITZPATRICK, S. G.; KATZ, J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. **J Dent**, v. 38, n. 2, p. 83-95, Feb 2010.

GADDIS, D. E.; MICHALEK, S. M.; KATZ, J. TLR4 signaling via MyD88 and TRIF differentially shape the CD4+ T cell response to Porphyromonas gingivalis hemagglutinin B. **J Immunol**, v. 186, n. 10, p. 5772-83, May 15 2011.

GAIO, E. J. et al. Oral health status in elders from South Brazil: a population-based study. **Gerodontology**, v. 29, n. 3, p. 214-23, Sep 2012.

GALVAO, M. P. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, n. 1, p. 56-62, Jan-Mar 2003.

GARROTE, L. F. et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. **Br J Cancer**, v. 85, n. 1, p. 46-54, Jul 6 2001.

GOLDIM, R. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais. 2.** Porto Alegre: 1997.

GONDIVKAR, S. M. et al. Chronic periodontitis and the risk of head and neck squamous cell carcinoma: facts and figures. **Exp Oncol**, v. 35, n. 3, p. 163-7, Sep 2013.

GRAVES, D. T. et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 2, p. 89-105, Feb 2008.

GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol**, v. 15, p. 117-32, 2012.

GUHA, N. et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 10, p. 1159-73, Nov 15 2007.

GULATI, M. et al. Essentials of Periodontal Medicine in Preventive Medicine. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 9, p. 988-994, Sep 2013.

HIRAKI, A. et al. Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 5, p. 1222-7, May 2008.

HUGOSON, A.; NORDERYD, O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 338-45, Sep 2008.

HUJOEL, P. P. et al. An exploration of the periodontitis-cancer association. **Ann Epidemiol**, v. 13, n. 5, p. 312-6, May 2003.

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

LAMBERT, R. et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 8, p. 633-41, Aug 2011.

LIBERMAN, D. N. et al. Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats. **Braz Oral Res**, v. 25, n. 1, p. 80-4, Jan-Feb 2011.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, n. 3, p. 321-9, Mar 1995.

MARSHALL, J. R. et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 28B, n. 1, p. 9-15, Jul 1992.

MARUYAMA, T. et al. Relationship between serum albumin concentration and periodontal condition in patients with head and neck cancer. **J Periodontol**, v. 83, n. 9, p. 1110-5, Sep 2012.

MEISEL, P. et al. Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. **Oral Oncol**, v. 48, n. 9, p. 859-63, Sep 2012.

MEURMAN, J.; BASCONES-MARTINEZ, A. Are oral and dental diseases linked to cancer? **Oral Dis**, Jul 4 2011.

MICHAUD, D. S. et al. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 2, p. 171-5, Jan 17 2007.

MICHAUD, D. S. et al. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 6, p. 550-8, Jun 2008.

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.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncol**, v. 42, n. 5, p. 448-60, May 2006.

MOTZ, G. T.; COUKOS, G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 10, p. 702-11, Oct 2011.

MOUTSOPOULOS, N. M.; MADIANOS, P. N. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1088, p. 251-64, Nov 2006.

MYNENI, S. R. et al. TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 501-9, Jul 1 2011.

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-Oct 1996.

NUNOSHIBA, T.; DEMPLER, B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. **Cancer Res**, v. 53, n. 14, p. 3250-2, Jul 15 1993.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 9-11, Jun 1997.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 454-60, Apr-May 2009.

PETERSEN, P. E.; BAEHNI, P. C. Periodontal health and global public health. **Periodontol 2000**, v. 60, n. 1, p. 7-14, Oct 2012.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J Periodontol**, v. 76, n. 12, p. 2187-93, Dec 2005.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-20, Nov 19 2005.

REZENDE, C. P. et al. Oral health changes in with oral and oropharyngeal cancer. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 4, p. 596-600, Jul-Aug 2008.

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.

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.

RIVALDO, E. G.; PADILHA, D. P.; HUGO, F. N. Alveolar bone loss and aging: a model for the study in mice. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 1966-71, Nov 2005.

RIVERA. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. Morphol.**, v. 30, n. 1, p. 309-314, 2012.

RIVERA et al. Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. **J Dent Res**, v. 90, n. 6, p. 799-803, Jun 2011.

ROSENQUIST, K. et al. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. **Acta Otolaryngol**, v. 125, n. 12, p. 1327-36, Dec 2005.

SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J Periodontal Res**, v. 17, n. 3, p. 263-74, May 1982.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-70, Mar 25 2011.

SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 3, p. e306-11, May 2011.

SHARMA, M. et al. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 5, p. 705-14, Oct 2011.

SHEU, B. C. et al. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. **Cancer**, v. 86, n. 8, p. 1537-43, Oct 15 1999.

SILVERMAN, S., JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J Am Dent Assoc**, v. 132 Suppl, p. 7S-11S, Nov 2001.

SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, v. 75, n. 7, p. 1033-41, Jul 2004.

TABA, M., JR.; SOUZA, S. L.; MARIGUELA, V. C. Periodontal disease: a genetic perspective. **Braz Oral Res**, v. 26 Suppl 1, p. 32-8, 2012.

TALAMINI, R. et al. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. **Br J Cancer**, v. 83, n. 9, p. 1238-42, Nov 2000.

TANG, X. H. et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 1 Pt 1, p. 301-13, Jan 1 2004.

TEZAL, M.; GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Is periodontitis associated with oral neoplasms? **J Periodontol**, v. 76, n. 3, p. 406-10, Mar 2005.

TEZAL, M. et al. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 9, p. 2406-12, Sep 2009.

TEZAL, M. et al. Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 133, n. 5, p. 450-4, May 2007.

VERED, M.; YAROM, N.; DAYAN, D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncol**, v. 41, n. 4, p. 337-9, Apr 2005.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J Oncol**, v. 32, n. 4, p. 729-37, Apr 2008.

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.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 5, p. 651-8, 2011.

ZHENG, T. Z. et al. Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. **Cancer Causes Control**, v. 1, n. 3, p. 235-41, Nov 1990.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO



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: 22959

Título: INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E CÂNCER LINGUAL INDUZIDO POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO) EM RATOS WISTAR

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CASSIANO KUCHENBECKER ROSING - coordenador desde 01/06/2012

MARCELO LAZZARON LAMERS - coordenador desde 01/06/2012

Marcelo Ekman Ribas - pesquisador desde 01/06/2012

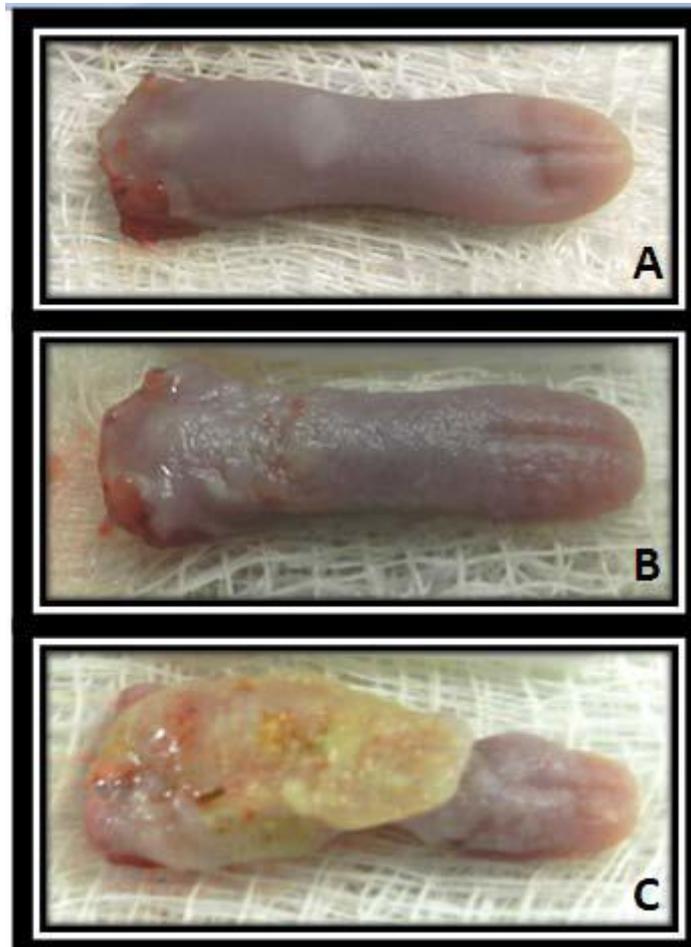
Tobias Rauber Spuldaro - pesquisador desde 01/06/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 17/09/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 108 ratos Wistar, machos 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, Sexta-Feira, 28 de Setembro de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – Macroscopia das Línguas dos Animais



Legenda: Macroscopia das línguas de um animal não exposto ao carcinógeno (A) e de um animal exposto ao 4NQO com lesão menos pronunciada (B) e de um animal exposto ao 4NQO com lesão maior (C).