

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**FOCOS PRÉ-NEOPLÁSICOS E PROLIFERAÇÃO CELULAR NO
MODELO DE CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA PELA
4NQO (4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO) EM RATOS WISTAR**

Renata Nunes da Silva

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**FOCOS PRÉ-NEOPLÁSICOS E PROLIFERAÇÃO CELULAR NO
MODELO DE CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA PELA
4NQO (4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO) EM RATOS WISTAR**

Renata Nunes da Silva

Orientadora: Dr^a. Mariângela Esther Alencar Marques

Co-orientador: Dr. Daniel Araki Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista -
UNESP para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2006

Dedicatória

Rei da criação, Senhor do poder da vida...

Senhor da Terra...

Senhor do ferro e da guerra, indomável e imbatível defensor da ordem...

Caçador da mata...

Deusa do amor, protetora das crianças, rainha das águas doces... das cachoeiras...

Senhor da justiça...

Senhor do arco-íris...

Senhora dos raios e tempestades...

Rainha das águas salgadas, mãe acolhedora...

Senhora das águas lodosas da junção entre o rio e o mar...

“Fui no jardim, colher as flores mais cheirosas, e a vovózinha, que me deu foi uma rosa..” ... É por isto que floresço a cada dia quando acordo...

Sem fé e confiança, jamais conseguiria alcançar os meus objetivos...

A minha vida, lhes entrego!

Homenagens

... Mãe, o que dizer?

O que dizer para aquela que me ensinou a lutar e a crescer na honestidade?

Teus ensinamentos produzem os frutos da verdade e cassam os direitos da mentira.

Tu és o cessar dos meus muitos choros reprimidos.

És o sorriso que em mim desponta, como o sol a denunciar um novo dia.

És as mãos que me erguem, as pernas que me sustentam e me fazem caminhar.

És parte da minha consciência.

Enfim, és o esteio da minha vida.

Teus cuidados e afetos fizeram com que eu me tornasse gente.

E hoje eu sou uma cidadã de bem!!!

Faltam palavras para agradecer os desejos renunciados, o sofrimento da ausência e toda ajuda que me destes em todos estes anos de minha vida.

Minha mãe, minha amiga, minha companheira... minha vida...

TE AMO, MÃE... POR TUDO ISTO E MUITO MAIS... ..

... Vózinha

Meu Deus... como expressar o que sinto pela senhora...

Simplesmente, não tenho palavras.. a única coisa que consigo fazer é agradecer...

Agradeço à Deus por ter me concedido todos estes anos ao seu lado...

E rezo para que muitos anos ainda existam.

Amo-te mais que tudo na vida!!!

... Pai tanta coisa a te dizer, mas por onde começar? Não sei... (in memoriam)

Tantas mãos fortes já seguraram as minhas, mas tuas mãos foram de fato verdadeiras.

Quantas vezes, busquei-as, confiante, pedindo tua ajuda e a segurança em qualquer hora.

Hoje, contemplo na memória as vezes que seguraste e com carinho de pai, aqueceste minhas mãos pequenas.

Dos seus bolsos, meu pai, tirei doces.

Do seu trabalho, meu pai, tirei vida.

Da sua vida de homem, meu pai, tirei modelo!

Até mesmo calado, me ensinaste o sentido de viver.

Tornaste o meu guia, minha vontade de lutar e vencer.

Assim, tornei-me forte, e, mesmo na saudade, sigo alegre com essa lembrança feliz que me acompanha pela vida.

Em prece agradecida, ainda busco tuas mãos de pai...

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, Dr^a. Mariângela Esther Alencar Marques

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer. Entre a sua mente e o seu corpo. Entre a sua educação e a sua recreação. Entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo..."

Obrigada...

Por compartilhar comigo um pouco de sua sublime experiência.

Pelos conselhos...

Pelas conversas...

Pela grandiosa convivência...

Serei eternamente grata por tudo que me ensinou, seja na vida profissional ou pessoal!!!

Dr. João Lauro Viana de Camargo

Exímio professor e pesquisador...

Muito Obrigada...

Pelas portas abertas...

Pela oportunidade cedida.

Por acreditar em minha capacidade profissional.

Pelas valiosas orientações neste trabalho.

E, sobretudo pela convivência.

Foi uma honra ter trabalhado com um profissional como o senhor.

Dr^a Márcia Guimarães da Silva

Símbolo de professora insigne...

Obrigada por me conferir as cópias das chaves que abrem as portas da arte de ensinar. Com você descobri o quanto é sublime e gratificante transmitir o conhecimento... A cada turma, uma nova experiência... a cada dia um novo exercício... e a cada instante um novo passo na longa jornada do amadurecimento. Tenha certeza que darei o melhor de mim para fazer jus de todo o aprendizado que me concedeste.

Muito obrigada por tudo!!!

Agradecimentos

Ao *Daniel Araki Ribeiro*, co-orientador, colaborador e cúmplice. Obrigada pelas grandiosas sugestões e orientações para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às amigas, *Flávia (SP)*, *Aline (Tté)*, *Meiroca (Tté)*, *Mariana e Meire...*

Amigo é você que faz o outro crescer, sem pensar em diminuir.

Amigo é você, sincero que diz as palavras certas no momento exato.

Amigo é você que não mede conseqüências para ajudar o companheiro de caminhada.

Amigo é você que elogia, critica, mas edifica.

Amigo é você, sempre presente, estando perto ou distante.

Jamais esquecido. Sempre lembrado pelos seus feitos. Pelo seu sorriso. Pelo seu carinho. Pelo seu carisma. Por sua determinação. Pelo brilho que do seu semblante irradia.

Um dos melhores presentes que ganhei na vida foi a amizade de vocês!!!

Valeu por tudo!!!

Aos amigos, *Shadia*, *Kékú*, *Xurupito*, *Pedirão*, *Rodrigo*, *Tony* e *Bruno*

Diferentes pessoas, diversos momentos, emoções inenarráveis... Cada um representa algo de especial para mim... levarei um pouquinho de vocês dentro do meu coração e espero ter deixado algo de mim em vocês. Valeu por todos os momentos vividos... Eu adoro todos vocês!!!

À um casal maravilhoso, *Carlota* e *Marquitos...*

Tratando-se de vocês, as palavras se tornam insuficientes para agradecer tudo que fizeram por mim. Serei eternamente grata por todo o carinho dedicado. Que Deus os abençoe, sempre!!!

Aos companheiros, colegas, amigos e pós-graduandos, *Alexandre, Ana Lúcia, Clarissa, Danilo, Elaine, Farofa, Glenda, João Paulo, Kátia, Kelly, Liane, Lizia, Marina, Merielen, Marcelo, Patrícia e Priscila*, pela pronta ajuda, risos e conselhos que tornaram estes três anos que estive junto de vocês mais fáceis e agradáveis.

À secretária da Pós-Graduação em Patologia, *Taninha*, pela presteza e carinho com que sempre atendeu as minhas solicitações. Muito Obrigada!

À todos os professores do Departamento de Patologia, em especial à Dr^a. *Daisy Maria Fávero Salvadori*, Dr^a *Denise Fecchio*, Dr^a *Maria Aparecida M. Rodrigues* e Dr^a *Maria Domingues*, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação, o meu muito obrigada!

Ao Dr. *Luís Fernando Barbisan*, pelo auxílio na dissertação, carinho, aprendizagem e idéias compartilhadas.

Ao *Luciano e Cristina Dórico*, minha gratidão por todas as vezes que necessitei de ajuda e encontrei em vocês aliados de eficiência incontestável.

À *Maria Luísa Ardanaz (Mara)* e *Paulo Roberto Cardoso*, pela incondicional ajuda no processamento do material histológico e pela amizade.

Ao *Paulo César Georgette* e *Glória Aparecida Rodrigues*, pela ajuda e participação durante toda a etapa experimental e pela atenção em todos os momentos.

Às minhas amigas, cúmplices e companheiras de república...

Sardela... Valeu pelos conselhos, broncas, conversas, gargalhadas, gozações, enfim... por tudo que vivemos juntas nestes anos... Sem os seus cuidados tudo se tornaria mais difícil. Vou embora carregando no coração, a grandeza de nossa amizade. Boa sorte em sua jornada pela vida!!!

Bixete... Nunca é demais repetir que você chegou para fazer minha vida mais divertida... tornou os meus dias mais movimentados do que já eram e acabou com a organização do meu quarto. Passou o ano todo me ganhando na lábia, né!!! ... rrsrsrs ... Mas, tudo bem... afinal de contas, nunca me importei com isto... Guardarei na memória os bons momentos que passamos juntas. “Não se esqueça de uma coisa... a graduação é a melhor época da vida de qualquer pessoa. Por isto, aproveite-a!!!”.

À República Cata Pulta, Erva Doce e agregados... Tabaco, Burn's, Machado, Treta, Mobral, Curió, Paçoka, Bodona, Pork, Socat, Arroba, Iza, Bovino, Rubisco, Castor e Mileto.

Vocês fizeram da minha vida uma diversão... Imaginem só... até um apelido eu ganhei!!! Valeu pelas conversas, risadas, baladas, cervejadas, jogos do Timão, InterUnesp, viagens, festas do Raul, festas de formatura, etc e tal. Valeu por acreditarem em mim e me encorajarem sempre. Sem o equilíbrio entre o profissional e o pessoal, eu jamais conseguiria passar estes anos em Botucatu. Vocês, também são um pouco responsáveis por esta vitória. Sucesso para todos vocês!!!

“Mi Possua”

À todos os funcionários do Departamento de Patologia, com quem convivi durante todo o período de minha pós-graduação. MUITÍSSIMO obrigada por tudo!!!

Suporte Financeiro

O presente trabalho foi realizado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Processo: 03/10030-2.

Processo: 02/09454-0.

O que é, o Que é?

O Que é, o Que é?

Composição: Gonzaguinha

Eu fico com a pureza da resposta das crianças

é a vida, é bonita e é bonita

viver, e não ter a vergonha de ser feliz

cantar e cantar e cantar

a beleza de ser um eterno aprendiz

ah, meu Deus, eu sei, eu sei

que a vida devia ser bem melhor e será

mas isso não impede que eu repita

é bonita, é bonita e é bonita

e a vida?

e a vida, o que é? diga lá meu irmão

ela é a batida de um coração?

ela é uma doce ilusão? ê ô

mas, e a vida?

ela é maravilha ou é sofrimento?

ela é alegria ou lamento?

o que é, o que é, meu irmão?

há quem fale que a vida da gente

é um nada no mundo

é uma gota no tempo

que não dá um segundo

á quem fale que é um divino mistério profundo

é o sopro do criador numa atitude repleta de amor

você diz que é luta e prazer

ele diz que a vida é viver

ela diz que o melhor é morrer

pois amada não é, e o verbo é sofrer

eu só sei que confio na moça

e na moça eu ponho a força da fé

somos nós que fazemos a vida

como der, ou puder ou quiser

sempre desejada, por mais que esteja errada

ninguém quer a morte, só saúde e sorte

e a pergunta roda, e a cabeça agita

eu fico com a pureza da resposta das crianças...

Índice

Índice

1. Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	03
2.1 Carcinogênese Química.....	03
2.2 Carcinogênese Bucal.....	04
2.3 Glutathiona-S-Transferase (GST).....	09
2.4 Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA).....	12
3. Objetivos.....	15
4. Referências Bibliográficas.....	16
5. Manuscrito.....	24-51

Introdução

1. Introdução

Dados recentes indicam que as taxas de incidência e mortalidade por câncer bucal variam ao redor do mundo, sendo as altas incidências registradas em alguns países em desenvolvimento, incluindo Índia, Paquistão e Bangladesh (IARC, 1992). No Brasil, os cânceres da cavidade bucal ocupam a 11ª posição entre os tumores malignos mais comuns, sendo que aproximadamente 90% são carcinomas espinocelulares (Funk et al., 2002). Projeções para o ano de 2006 apontam este tumor como a 5ª forma de neoplasia mais freqüente entre os homens e a 7ª entre as mulheres (INCA, 2005). É importante ressaltar que apesar dos esforços dedicados a esta área, as taxas de sobrevivência não se alteraram significativamente durante os últimos 20 anos (Van der Tol IG, 1999), sendo que apenas 3% dos casos são diagnosticados precocemente (Reid et al., 2000). Entre 50% e 70% dos pacientes morrem dentro de cinco anos devido, principalmente, ao comportamento agressivo do tumor representado pelas recidivas locais e metástases à distância (Van der Tol IG, 1999). Diagnóstico tardio, ausência de biomarcadores apropriados para o diagnóstico precoce e deficiência na resposta das neoplasias à terapia, são os principais fatores implicados no prognóstico sombrio (Forastiere, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstraram que os fatores associados ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer bucal estão bem estabelecidos, destacando-se o tabagismo e o etilismo (Maccann et al., 2000; Mashberg, 1993). O álcool e o tabaco representam riscos diretamente proporcionais às quantidades ingeridas podendo, isoladamente, aumentar o risco em duas a três vezes. Quando o uso é combinado, o risco pode aumentar em até 15 vezes (Rice e Spiro, 1989). Dietas pobres em frutas e vegetais; agentes biológicos como o papiloma vírus humano (HPV); irritação mecânica

crônica como ação de bordas cortantes dos dentes sobre a mucosa bucal e o uso de próteses mal adaptadas; radiações devido à luz solar no caso de câncer labial; exposição a agentes como, o asbesto e níquel, além da má higiene bucal podem também, ocasionar alterações epiteliais que tornam a mucosa bucal mais vulnerável à ação de agentes cancerígenos (McIntyre et al., 1999).

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1 Carcinogênese Química

O reconhecimento de que a exposição prolongada a certas substâncias químicas pode atuar como fator etiológico para o aumento do risco de câncer, teve início em meados do século XVIII, com as observações de Sir Percival Pott, que relatou incidência aumentada de câncer escrotal nos limpadores de chaminés em decorrência da exposição crônica à fuligem. Diante desta observação, muitos pesquisadores desenvolveram testes experimentais de longa duração para avaliar o potencial cancerígeno de substâncias consideradas suspeitas (Ito et al., 1991; Chhabra et al., 1990; Gart et al., 1986; Montesano et al., 1986). Esses ensaios proporcionaram boa reprodutibilidade e confiabilidade, porém, requerem longo tempo de acompanhamento dos animais para observação de neoplasias quimicamente induzidas, o que os torna dispendiosos e de execução laboriosa.

Como alternativa, propôs-se a utilização dos modelos de carcinogênese experimental com menor duração, consagrados como testes de carcinogênese de média duração (Hagiwara et al., 1993). Atualmente, esse modelo tem como objetivos o melhor entendimento das múltiplas etapas envolvidas no desenvolvimento de tumores malignos causados por agentes ambientais, a investigação de estratégias para detecção precoce, interrupção do processo cancerígeno, bem como a otimização do prognóstico de pacientes acometidos por esta malignidade (Mognetti, 2005; Ribeiro et al., 2005).

A carcinogênese química experimental caracteriza-se por um processo multifatorial que envolve quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação. A iniciação possui caráter irreversível e se caracteriza por eventos

mutacionais induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos; a promoção é um processo mais lento e reversível, no qual está associada à proliferação focal de células iniciadas e a progressão, caracteriza-se por aneuploidia e instabilidade genômica. Quando as alterações estruturais adquiridas pelas células se tornam diretamente relacionadas com a capacidade de invadir e metastizar, estar-se-á diante da etapa de manifestação clínica do tumor (Pitot, 1989; Nowell, 1986).

2.2 Carcinogênese Bucal

A elaboração dos modelos de carcinogênese bucal induzida teve início com as investigações de Salley (1954), demonstrando que os carcinomas espinocelulares podem ser produzidos na bolsa jugal de hamsters, por meio de múltiplas aplicações locais de agentes cancerígenos químicos, baseado no sistema iniciação/promoção da carcinogênese. Para avaliar a suscetibilidade do epitélio de hamsters à ação de agentes cancerígenos, o autor desenvolveu uma técnica a fim de produzir tumores epiteliais malignos. Os tumores desenvolvidos variavam de papilomas a carcinomas espinocelulares com metástases para linfonodos. Posteriormente, Salley (1957) utilizou a mesma metodologia para demonstrar a evolução da carcinogênese, constatando que há pelo menos quatro estágios precedentes à neoplasia induzida: inflamação, degeneração, regeneração e hiperplasia. Em 1961, com o objetivo de contribuir para a padronização de métodos que avaliem a carcinogênese bucal, Morris observou que animais com 3, 6 e 9 meses de idade não apresentavam diferença no período de latência para o desenvolvimento de tumores.

Desde os trabalhos de Salley, vários pesquisadores têm trabalhado com a finalidade de padronizar testes de média-duração para avaliar o potencial cancerígeno

(agentes que atuam como iniciadores e/ou promotores) de compostos químicos, usando como parâmetros lesões no DNA (testes de mutagenicidade e genotoxicidade) e lesões pré-neoplásicas em diferentes órgãos alvos (Nauta, 1996; Lippman et al., 1990). Deste modo, várias substâncias estão sendo utilizadas em modelos de carcinogênese bucal quimicamente induzida, entre elas o DMBA (dimetilbenzantraceno), um hidrocarboneto aromático policíclico com potencial cancerígeno bem estabelecido (Chen et al., 2002; Schwartz et al., 2000; Iida et al., 1999; Chen & Lin, 1996) e o benzopireno, um dos componentes do cigarro (Schwartz et al., 2004).

Wallenius e Lekholm (1973) utilizaram a 4-Nitroquinolina 1-Óxido (4NQO), como agente cancerígeno, de forma pioneira em modelos de carcinogênese bucal murina, por meio de múltiplas aplicações locais do agente químico no palato de ratos, induzindo displasia epitelial e carcinoma espinocelular. Subseqüente a este primeiro estudo, Ohne et al. (1983) fizeram uso de 0,001% da 4NQO em água de beber. Os autores obtiveram 100% de incidência de carcinomas espinocelulares na mucosa bucal murina. Assim, foi demonstrado que a 4NQO é agente efetivo para o desenvolvimento de tumores.

Com o objetivo de investigar a suscetibilidade de diferentes linhagens de ratos a 4NQO, Kitano et al. (1992), observaram o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares em sete espécies, demonstrando que há variação na suscetibilidade ao desenvolvimento destes tumores.

A 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) é agente alquilante de uso sistêmico utilizado em modelos de carcinogênese experimental da mucosa bucal murina (Kaplan et al., 2001; Tanaka et al., 1998; Nauta et al., 1996), capaz de produzir lesões pré-neoplásicas e malignas, semelhantes àquelas encontradas na cavidade bucal de seres

humanos (Nauta et al., 1996). Além disto, promove mutagenicidade em ratos (Patel et al., 1995), xerostomia e desorganização nuclear (Kaplan et al., 2001; Rich e Reade, 1996).

O modo de ação pelo qual a 4NQO exerce sua atividade carcinogênica na mucosa bucal tem sido investigado por vários pesquisadores (Benson, 1993). Booth (1990) sugeriu que a ação das nitroredutases na cavidade bucal de ratos é diretamente proporcional à distribuição dos carcinomas espinocelulares induzidos pela 4NQO. Na tentativa de esclarecer o papel das nitroredutases na cavidade bucal perante a atividade carcinogênica da 4NQO, verificou-se que as mesmas (NADPH-quinona oxiretuase, principalmente) convertem a 4NQO em 4-acetoaminoquinolina 1-óxido (4ANQO) capaz de gerar adutos na N2-guanina, C8-citosina e N6-adenina (Bailleul et al., 1989). Seril-tRNA sintetase, bem como radicais livres, podem também contribuir para a ativação da 4ANQO em células eucarióticas (Tada, 1975). Dessa forma, a 4NQO é capaz de induzir um amplo espectro de lesões genéticas, tais como quebras de fita simples e duplas de DNA, além de sítios álcali-lábeis e sítios incompletos de reparo (Vered et al., 2003; Okazaki et al., 2002). Acreditando que a 4NQO poderia desempenhar papel relevante nas fases de progressão e manifestação da carcinogênese, por se tratar de um carcinógeno completo, ensaios experimentais *in vivo* foram conduzidos a fim de verificar a eficácia de tal composto na indução de lesões cancerizáveis e malignas no epitélio da mucosa bucal (Okazaki et al., 2002; Nishimura, 1999) (Figuras 1 e 2).

Alguns países, como o Japão e os Estados Unidos da América, destacam-se na utilização dos modelos de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO. No Brasil esta área do conhecimento é ainda incipiente.



Figura 1: Aspecto macroscópico da superfície dorsal da língua durante o processo de carcinogênese. (A) Mucosa normal (B) Aspecto irregular com alterações leves (C) Aspecto irregular com alterações moderadas, caracterizadas por placas brancas (leucoplasias) (D) Aspecto irregular com alterações grosseiras e depressões (E) Lesão exofítica (F) Placa branca comprometendo toda a superfície posterior da língua (G) Lesão exofítica ulcerada na borda lateral da língua (H) Lesão ulcerada com mancha vermelha (eritroplasia) comprometendo a porção posterior da língua

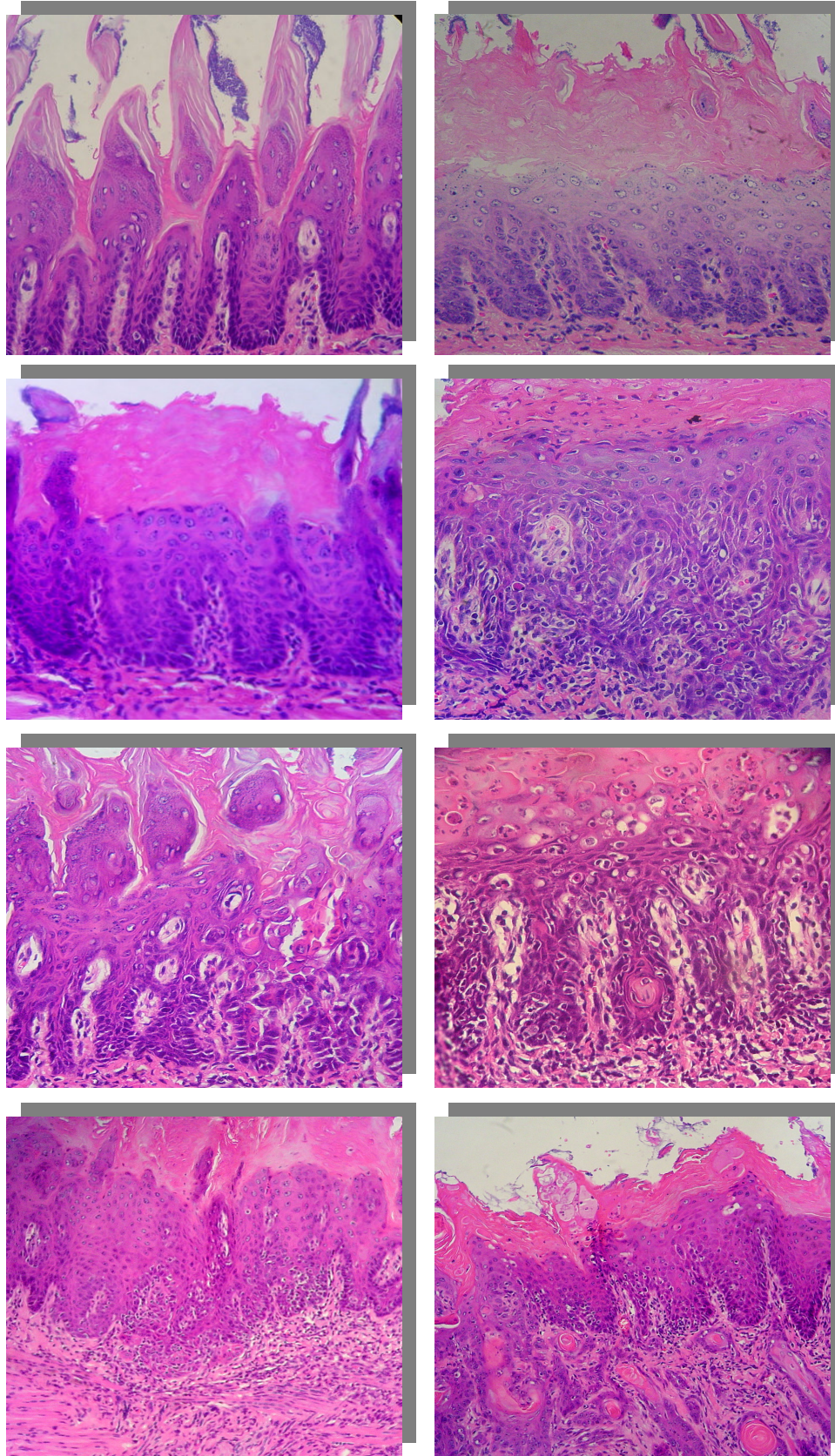


Figura 2: Análise histopatológica durante a evolução da carcinogênese (A) Mucosa lingual do dorso da língua normal (B) Hiperplasia e hiperqueratose sem displasia (C) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia leve (D) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia moderada (E) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia grave (F) Carcinoma *in situ* (G) Carcinoma espinocelular microinvasivo (H) Carcinoma espinocelular bem diferenciado invasivo. (H.E). (Aumento 100X).

2.3 Glutathione-S-Transferase

A busca por biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias malignas é cada vez mais intensa. É bem estabelecido que diversos xenobióticos participam na etiopatogenia de certas doenças. A fim de minimizar ou mesmo impedir seus efeitos, as células eucarióticas possuem sistemas de metabolização de xenobióticos, que são divididos em dois tipos principais: os de metabolismo oxidativo ou de Fase I e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Muitas famílias enzimáticas participam desse processo, incluindo os citocromos P450 (CYPs), as glutathione-S-transferases (GSTs), as N-acetil-transferases (NATs), UDP-glucuroniltransferases e sulfotransferases. De forma geral, esse maquinário biológico é responsável pela redução a metabólitos inativos, que são prontamente eliminados do organismo, ou se ligam às macromoléculas (DNA, RNA e proteínas). A ligação dos metabólitos reativos com o DNA, por exemplo, poderá provocar lesões que, se não reparadas, serão fixadas como mutações, levando a transformações celulares e, por conseguinte no desenvolvimento de doenças degenerativas, tais como o câncer (Vogl et al., 2004). Com este objetivo, diversos biomarcadores estão sendo descritos para detectar lesões precoces em diferentes órgãos.

Glutathione-S-Transferases (GSTs) correspondem à família de isoenzimas de detoxificação de fase II, cuja principal função é a conjugação de glutathionas a sítio eletrofílico de amplo espectro de compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos, convertendo-os a espécies biocompatíveis, favorecendo sua excreção (Hayes e Pulford, 1995). Cinco classes de GSTs (α , μ , π , θ , ξ) foram identificadas em seres humanos, sendo cada classe codificada por famílias de genes ou por genes isolados (Vogl et al., 2004).

Estudos demonstraram que a GST da família de classe π funciona como adequado biomarcador para a detecção de lesões precoces e potencialmente malignas em seres humanos, apresentando níveis elevados em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de estômago, cólon, bexiga e pulmão (Iida et al., 1999; Shimizu et al., 1995; Mulder et al., 1995). A GST π humana é equivalente à GST forma placentária (GST-P) no que tange os padrões imunológicos e enzimáticos (Chen & Lin, 1996). Deste modo, focos GST-P+ em fígado têm sido freqüentemente utilizados como biomarcador em modelos de carcinogênese experimental. Tal expressão foi relatada em diversos estudos (De Camargo et al., 1993; Lippman et al., 1990). Nas últimas décadas, alguns autores descreveram a imunoreatividade do GST-P na mucosa bucal, especialmente àquelas localizadas na língua, durante o processo de carcinogênese experimental (Chen & Lin, 1996; Zhang et al., 1992). Nesses estudos, utilizaram o DMBA como agente cancerígeno para induzir tumores na bolsa jugal de hamsters, associados aos achados imunoistoquímicos resultantes da expressão do GST-P. Os resultados obtidos demonstraram aumento da imunoreatividade do GST-P durante o processo de progressão da carcinogênese bucal.

Li et al. (1999,1997), investigaram a expressão de focos GST-P+ na língua de ratos induzida pela 4NQO, durante o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares, quantificando o número de focos GST-P+ de acordo com a progressão da carcinogênese em duas espécies murinas. Os autores constataram diferenças significativas na suscetibilidade das espécies em desenvolver carcinomas espinocelulares induzidos pela 4NQO. A imunoreatividade, também variou de acordo com a linhagem utilizada. Estas diferenças na resposta ao GST-P+ à exposição da 4NQO podem ser determinadas

geneticamente, podendo contribuir para a diferença na tumorigênese entre as diversas linhagens de ratos (Li, 1999) (Figura 3).

Apesar dos resultados apresentados, novos estudos devem ser realizados para patentear o papel do GST-P como biomarcador seguro na carcinogênese bucal, especialmente utilizando a 4NQO como agente cancerígeno.

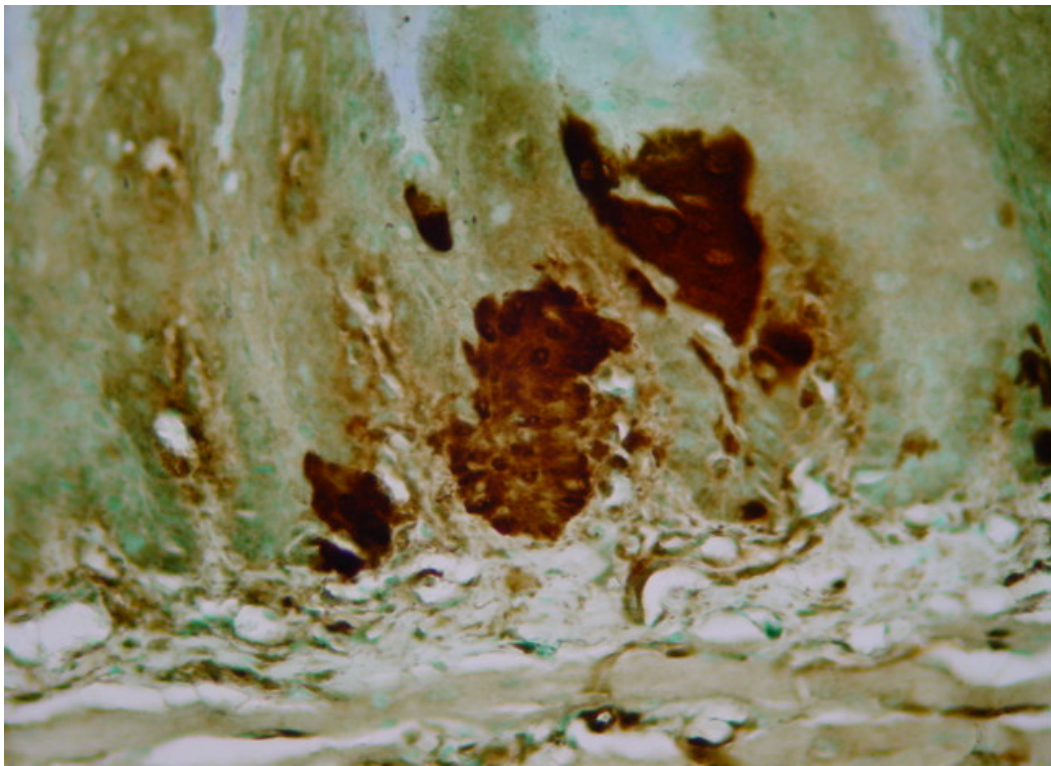


Figura 3: Imunoistoquímica para marcador GST-P
Foco GST-P+ instalado na mucosa histologicamente normal (Aumento 100X).

2.4 Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

O índice de proliferação celular de lesões potencialmente malignas representa peça chave no processo cancerígeno (Van Diest et al., 1998). Diversas técnicas têm sido propostas para quantificar a proliferação celular dessas lesões em roedores e seres humanos, incluindo técnicas de imunistoquímica com anticorpos monoclonais, amplamente utilizados (Eldrige e Goldsworthy, 1996; Thor e Edgerton, 1995). O controle dos mecanismos envolvidos na proliferação celular é um dos princípios fundamentais ao estado de equilíbrio orgânico. Alterações neste controle podem levar ao surgimento de lesões proliferativas (Huang et al., 1994).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, relacionada à síntese de DNA no ciclo celular. Duas populações foram descritas; uma forma nucleoplasmática, solúvel em substâncias detergentes, presentes durante o ciclo celular em baixos índices e uma outra forma, em estado insolúvel associada à estrutura nuclear. Esta última expressão é preservada em tecidos fixados e mostra síntese significativamente aumentada durante a fase de proliferação celular (Thor e Edgerton, 1995). A síntese desta proteína inicia no momento final da fase G1 e alcança pico máximo durante a fase S do ciclo celular (Celis et al., 1987). Portanto, o PCNA é marcador endógeno capaz de se expressar, distintamente, em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) (Eldrige e Goldsworthy, 1996; Monticello et al., 1995).

Tecidos que não proliferam ou que possuem baixo índice de proliferação celular, exibem fraca imunoreatividade pela técnica anti-PCNA. Sendo assim, nenhuma marcação é visível, como por exemplo, no sistema nervoso (central ou periférico) de animais adultos e na musculatura esquelética (lisa ou cardíaca). Ao contrário de outras

técnicas de estudo de proliferação, como as de H³-timidina e BrdU, o PCNA é favorecido pela simplicidade de execução e pela identificação de células em diferentes fases do ciclo celular (índice de proliferação – IP), podendo revelar informações potencialmente críticas sobre o efeito do agente químico nas populações de células proliferantes (Joley et al., 1991). Por essa razão, o PCNA tem sido empregado em estudos com o objetivo de investigar a atividade proliferativa em diferentes órgãos como o pulmão, cérebro, próstata e mucosa bucal (Capello et al., 2003, Schwartz et al., 2000) (Figura 4).

Nosso grupo de pesquisa recentemente investigou biomarcadores no modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO, tais como instabilidade genômica e apoptose (Ribeiro et al., 2005,2004). Todavia, muito ainda deve ser realizado para que se possa compreender a etiopatogenia da carcinogênese bucal. Neste sentido, o estudo da expressão de focos GST-P+ e da proliferação celular nesse modelo certamente contribuirá para melhor entendimento da patogênese do câncer bucal.

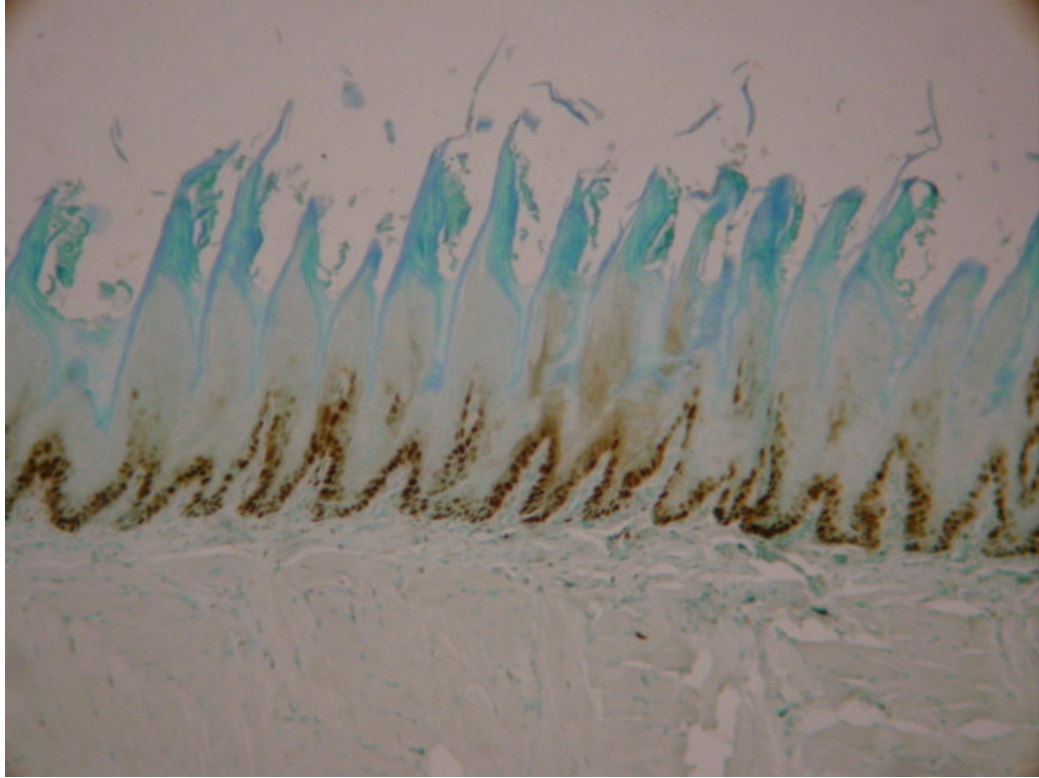


Figura 4: Imunoistoquímica para marcador PCNA
Epitélio normal com marcação de proliferação celular (PCNA) (Aumento X25)

Objetivos

3. Objetivos

Com base nas considerações anteriores, o presente estudo propôs avaliar a expressividade de focos de GST-P+ (Glutathione-S-Transferase Placentária) e PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) na mucosa bucal murina. O modelo foi padronizado em ratos Wistar utilizando a 4NQO (4-Nitroquinolina 1-Óxido) como agente cancerígeno.

Foram avaliados parâmetros macroscópicos, histopatológicos e imunoistoquímicos, conforme relacionados a seguir:

- Alterações macroscópicas na mucosa bucal;
- Alterações histopatológicas na mucosa bucal, coradas com hematoxilina e eosina;
- Expressão de focos de GST-P+ na mucosa bucal;
- Expressão de PCNA na mucosa bucal.

Referências Bibliográficas

4. Referências Bibliográficas*

1. Bailleul B, Daubersies P, Galiegue-Zuitina S, Loucheux-Lefebvre MH. Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1989; 80:691–7.
2. Benson AM. Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide by a dicumarol-resistance hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice. *Biochem Pharmacol.* 1993;46:1217-21.
3. Booth DR. A relationship found between intra-oral sites of 4NQO reductase activity and chemical carcinogenesis. *Cell Tissue Kinet.* 1990;23:331–40.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2006. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
5. Capello F, [Rappa F](#), [David S](#), [Anzalone R](#), [Zummo G](#). Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2003;23:1325-31.
6. [Celis JE](#), [Madsen P](#), [Celis A](#), [Nielsen HV](#), [Gesser B](#). Ciclyn (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase δ) is a central component of the pathway (s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett.* 1987;220:1-7.
7. Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Immunohistochemical demonstration of p73 protein in the early stages of DMBA-induced squamous-cell carcinogenesis in hamster buccal pouch. *Arch Oral Biol.* 2002;47:695-9.
8. Chen YK, Lin LM. Sequential expression of placental glutathione-S-transferase (GST-P) during DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 1996;25:388-94.

9. Chhabra RS, Huff JE, Schwetz BS, Selkirk J. An overview of prechronic and chronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environ Health Perspect.* 1990;86:313-43.
10. De Camargo JLV, Tsuda H, Asamoto M, Tagawa Y, Wada S, Nagase S, et al. Modifying effects of chemicals on the development of liver preneoplastic placental glutathione S-transferase positive foci in Analbuminemic and Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 1993;2:409-16.
11. Eldridge SR, Goldsworthy SM. Cell proliferation rates in common cancer target tissues of B6C3F1 mice and F344 rats: Effects of age, gender, and choice of marker. *Fundam Appl Toxicol.* 1996;32:159-67.
12. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Méd.* 2001;345:1890-900.
13. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trash DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A National Cancer Data Base report. *Head Neck.* 2002;24:165-80.
14. Gart JJ, Krewski D, Lee PN, Tarone RE, Wanrendorf J. Statistical methods in cancer research. Volume III. The design and analysis of long-term animal experiments. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1986. (IARC Sci Publ, 79).
15. Hagiwara A, Tanaka H, Imaida I, Tamano S, Fukushima S, Ito N. Correlation between medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay data and long-term observation results in rats. *Jpn Cancer Research* 1993;84:237-45.

16. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30:445-600.
17. Huang WY, [Coltrera M](#), [Schubert M](#), [Morton T](#), [Truelove E](#). Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994;78:748-54.
18. Iida K, Yamamoto M, Kato M, Yoshida K, Kurita K, Tatematsu M. Strong expression of glutathione S-transferase placental form in early preneoplastic lesions and decrease with progression in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1999;135:129-36.
19. Ito N, Shirai T, Hasegawa R. Medium-term bioassay for carcinogens using multiorgan models. *Prog Exp Tumor Res.* 1991;33:41-57.
20. Joley J, Dietrich DR, Swenberg JA, Maronpot RR. Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *J Histochem.* 1991;14:237-41.
21. Kaplan I, Engelberg J, Dayan D. The effect of desalivation on 4-nitroquinoline 1-oxide induced tongue carcinogenesis: a morphometric study of nucleolar organizer regions. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:48-52.
22. Kitano M, Hatano H, Shisa J. Strain difference of susceptibility to 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinoma in rats. *Jpn J Cancer Res.* 1992;83:843-50.
23. Li TJ. Altered placental glutathione S-transferase foci as a tumor marker during rat lingual carcinogenesis. *Chin J. Dent. Res.* 1999;2:49-53.

24. Li TJ, Hirayama Y, Kitano M. Glutathione S-transferase π -class as a tumour marker in lingual preneoplastic and neoplastic lesions of rats and humans. *Virchows Arch.* 1997;43:431-47.
25. [Lippman SM](#), [Lee JS](#), [Lotan R](#), [Hittelman W](#), [Wargovich MJ](#), [Hong WK](#). Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990;82:555-60.
26. Maccann MF, Macpherson LMD, Gibson J. The role of the general dental practitioner in detection and prevention of oral cancer: a review of literature. *Dent. Update.* 2000;27:404-8.
27. Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer.* 1993;72:1369-75.
28. McIntyre GT, Oliver RJ. Update on precancerous lesions. *Dent Update.* 1999;26:382-6.
29. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol.* in press 2005.
30. Montesano R, Bartsh H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. Long-term and short-term assay for carcinogens. A critical appraisal. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1986. (IARC Sci Publ, 83).
31. [Monticello TM](#), [Barton D](#), [Ma X](#), [Babish JG](#), [Durham SK](#). Comparison of acute hepatocellular proliferating cell nuclear antigen labeling indices and growth fractions, p34cdc2 kinases, and serum enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *Toxicol Pathol.* 1995;23:439-46.

32. Morris AL. Factor influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J. Dent. Res.* 1961;40:3-15.
33. Mulder TPJ. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis.* 1995;16:619-24.
34. Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck.* 1996;18:441-9.
35. Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis. *J Dent Res.* 1999;78:1264-9.
36. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1986;46:2203-7.
37. Ohne M, Omori K, Kobayashi A, Sakurada Y, Sekigawa D, Mochizuki A, et al. Induction of squamous cell carcinoma in the oral cavity of rats by oral administrations of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in the drinking water. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1983;22:85-93.
38. Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002;38:562-73.
39. Patel V, Pouloupoulos AK, Levan G, Game SM, Everson JW, Prime SS. Loss of expression of basement membrane proteins reflects anomalies of chromosomes 3 and 12 in the rat 4-nitroquinoline N-oxide model of oral carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1995;16:17-23
40. Pitot HC. The terminal stage in carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989;80:599-607.
41. Pottier D. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ.* 1992; (120):147-7.

42. Reid BC, Winn DM, Morse DE, Pendry DG. Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends, and survival. *Oral Oncol.* 2000;36:414-20.
43. Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques MEA. 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.* 2005;86:375-81.
44. Ribeiro DA, Salvadori DM, Silva RN, Darros BR, Marques MEA. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cell can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2004;40:910-5.
45. Rice DH, Spiro RH, 1989, apud Thuler LCS, Rebelo MS, 1999.
46. Rich AM. and Reade PC. Nuclear morphometry in experimental oral mucosal carcinogenesis. *Eur J B Oral Oncol.* 1996;32B:169-75.
47. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. *J Dent Res.* 1954;33:253-62.
48. Salley JJ. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *J Dent Res.* 1957;36:48-55.
49. Schwartz J, Baker V, Larios E, Desai D, Amin S. Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2004;40:611-23.
50. Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol.* 2000;36:225-35.
51. [Shimizu K](#), [Toriyama F](#), [Zhang HM](#), [Yoshida H](#). The expression of placental-type glutathione S-transferase (GST- π) in human cutaneous carcinoma in situ,

- that is, actinic keratosis and Bowen's disease, compared with normal human skin. *Carcinogenesis*. 1995;16:2327-30.
52. Tada M. Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature*. 1975;255:510-2.
53. [Tanaka T](#), [Kawabata K](#), [Kakumoto M](#), [Matsunaga K](#), [Mori H](#), [Murakami A](#), et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis*. 1998;19:425-31.
54. Thor AD, Edgerton SM. Cellular markers of proliferation and oncogenes. *Diag Immunopathol*. 1995;669-722.
55. Van der Tol IG, de Visscher JG, Jovanovic A, van der Waal I. Risk of second primary cancer following treatment of squamous cell carcinoma of the lower lip. *Oral Oncol*. 1999;35:571-4.
56. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*. 1998;51:716-24.
57. Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol*. 2005;41:337-9.
58. Vered M, Daniel N, Hirshberg A, Dayan D. Histomorphologic and morphometric changes minor salivary glands of the tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2003;39:491-6.
59. Vogl FD, Taioli E, Maugard C, Zheng W, Pinto LFR, Ambrosone C, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and Breast Cancer: A Pooled Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:1473-9.
60. Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Odontol Revy*. 1973;24:39-48.

61. Zhang L, Moch D, Cameron R. Development of glutathione S-transferase placental form (GST-P) stained foci during hamster buccal pouch mucosa carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1992;64:241-7.

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

Manuscrito

Focos pré-neoplásicos e proliferação celular no modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) em ratos Wistar

R.N. Silva*, D.A. Ribeiro, B.R. Darros, M.E.A. Marques

Departamento de Patologia, Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – TOXICAN, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Correspondência:

Renata Nunes da Silva

Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – TOXICAN

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Distrito de Rubião Jr. s/n

Cep: 18618-000

Botucatu – SP

Brasil

Tel. +55 14 38828255

Fax: +55 14 38152348

E-mail: re_aden@terra.com.br

#Manuscrito de acordo com as normas da Revista Oral Diseases (Head & Neck Sciences)

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar a expressão de focos GST-P+ (Glutathione-S-Transferase Placentária) e PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) no modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO (4-Nitroquinolina 1-Óxido). Foram utilizados 90 ratos Wistar machos distribuídos em 6 grupos tratados com 10 e 50ppm da 4NQO em água de beber, durante quatro, 12 e 20 semanas e 30 animais como controle negativo. Após quatro semanas de tratamento, foram observadas alterações caracterizadas por imunexpressão de células isoladas ou em grupo ao longo da camada basal do epitélio, designadas como pré-focos, além de focos GST-P+ na mucosa bucal histologicamente normal. Constatou-se, imunoreatividade do GST-P nas lesões displásicas e nos carcinomas espinocelulares em 12 e 20 semanas de tratamento respectivamente. Quanto ao PCNA, não foi observado aumento na expressão da mucosa bucal histologicamente normal, em quatro semanas pós-tratamento. Após 12 e 20 semanas de administração da 4NQO, foi evidenciado aumento na expressão do PCNA nas lesões hiperplásicas e displásicas, em relação ao grupo controle. Nos carcinomas espinocelulares, a grande maioria das células tumorais mostrou-se positiva para o anticorpo utilizado. Em conclusão, o GST-P apresentou-se um biomarcador adequado para avaliar a progressão do câncer bucal e o PCNA poderá ser utilizado para quantificar a proliferação celular durante a carcinogênese bucal quimicamente induzida em modelos experimentais.

Palavras-chaves: carcinogênese bucal, 4-Nitroquinolina 1-Óxido, GST-P+, PCNA, ratos Wistar.

Abstract

The goal of this study was to evaluate the expressivity of GST-P+ foci (placental glutathione S-transferase) and PCNA (cellular proliferation nuclear antigen) in the medium-term oral carcinogenesis assay induced by 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide). A total of 90 Wistar rats were distributed into six groups and treated with 4NQO at 10 and 50ppm dose in drinking water during four, 12 and 20 weeks. 30 animals were used as negative control. Following four weeks-treatment, immunoreactivity of single cells or grouped cells were evidenced throughout basal layer of epithelium depicted as pre-foci. In this period, GST-P+ foci were observed in 'normal' oral mucosa as well. In dysplastic lesions and squamous cell carcinomas after 12 and 20-weeks treatment respectively, there was immunoreactivity for GST-P+. Regarding PCNA immunomarker, no increase was observed in the 'normal' histologically mucosa for both doses used. After 12 and 20-weeks of 4NQO administration, an increase of PCNA-positive nuclei was detected in hyperplastic and dysplastic lesions, when compared to negative control. In well-differentiated squamous cell carcinomas, the majority of malignant cells displayed immunoreactivity for this antibody used. In summary, GST-P is a suitable biomarker for evaluating the progression of oral cancer and PCNA may be used to quantify the cell proliferation activity during rat tongue carcinogenesis.

Key words: carcinogenesis oral, 4-nitroquinoline 1-oxide, GST-P+, PCNA, Wistar rats

1. Introdução

No Brasil, os cânceres da cavidade bucal ocupam a 11^a posição entre os tumores malignos mais comuns, sendo que aproximadamente 90% são carcinomas espinocelulares (Funk et al., 2002). Entre os fatores etiológicos associados destacam-se o tabagismo e o etilismo (Maccann et al., 2000) ou o efeito sinérgico de ambos (Keller, 1967; Mashberg, 1993).

Os modelos de carcinogênese bucal constituem um importante instrumento para avaliar o desenvolvimento de neoplasias malignas, causadas por agentes químicos, utilizando carcinógenos sintéticos que atuam como agentes iniciadores e/ou promotores da carcinogênese. Atualmente diversos pesquisadores têm trabalhado com a finalidade de padronizar testes de média-duração em modelos de carcinogênese bucal quimicamente induzida. Deste modo, várias substâncias estão sendo testadas, como é o caso do DMBA (dimetilbenzantraceno), um hidrocarboneto aromático policíclico com potencial cancerígeno bem estabelecido (Chen & Lin, 1996; Iida et al., 1999; Chen et al., 2002) e o benzopireno, um dos componentes do cigarro (Schwartz et al., 2004).

A 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) é agente alquilante de uso sistêmico utilizado em modelos de carcinogênese experimental da mucosa bucal murina (Nauta et al., 1996; Tanaka et al., 1998; Kaplan et al., 2001; Schwartz et al., 2004), capaz de produzir lesões pré-neoplásicas e malignas, que reproduzem àquelas encontradas na cavidade bucal de seres humanos (Nauta et al., 1996).

É bem estabelecido que diversos xenobióticos participam na etiopatogenia de certas doenças. A fim de minimizar ou mesmo impedir seus efeitos, as células eucarióticas possuem sistemas de metabolização de xenobióticos, divididos em dois

tipos principais: os de metabolismo oxidativo ou de Fase I e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Glutathione-S-Transferases (GSTs) correspondem à família de isoenzimas de detoxificação de fase II, cuja principal função é a conjugação de glutathionas a um sítio eletrofílico de amplo espectro de compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos, convertendo-os a espécies biocompatíveis, favorecendo sua excreção (Hayes e Pulford, 1995). Diversos estudos relataram que focos GST-P+ em fígado são frequentemente utilizados como biomarcador em modelos de carcinogênese experimental (Lippman et al., 1990; De Camargo et al., 1993). Nas últimas décadas, alguns autores descreveram a imunoreatividade do GST-P na mucosa bucal, especialmente àquelas localizadas na língua, durante o processo de carcinogênese experimental (Zhang et al., 1992; Chen & Lin, 1996; Li et al., 1997,1999).

Considerando a importância da proliferação celular como mecanismo biológico da tumorigênese, índices elevados de proliferação celular devem ser esperados em vários tipos de câncer (Tubiana et al., 1989; Van Diest PJ et al., 1998). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, relacionada à síntese de DNA no ciclo celular. A síntese desta proteína inicia no momento final da fase G1 e alcança pico máximo durante a fase S do ciclo celular (Celis et al., 1987). Assim, o PCNA tem sido empregado em diferentes órgãos como o pulmão, cérebro, próstata e lesões pré-neoplásicas da mucosa bucal (Schwartz et al., 2000; Capello et al., 2003).

Com base nesta premissa, o presente estudo propôs avaliar a expressão de focos GST-P+ e PCNA no modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO em ratos Wistar.

2. Materiais e métodos

2.1. Condições Experimentais

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade e aproximadamente 200g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno e permaneceram sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão. Receberam água e ração *ad libitum*.

2.2. Delineamento experimental

Os animais distribuídos em 9 grupos de 10, foram sacrificados nos seguintes momentos: quatro, 12 e 20 semanas, após o início do experimento. Estes períodos foram estabelecidos de acordo com a recomendação da literatura, para lesões pré-neoplásicas e carcinomas espinocelulares, respectivamente (Nishimura, 1999). Para todos os animais foi administrada a 4NQO em água de beber, uma vez que três grupos receberam o cancerígeno na concentração de 10ppm e outros três grupos na concentração de 50ppm. Sendo que, 30 animais foram utilizados como controle negativo (Figura 1).

2.3. Análise Histopatológica

A avaliação histopatológica das lesões na mucosa bucal foi realizada segundo Kramer et al. (1978) com algumas adaptações: mucosa normal; hiperplasia e hiperkeratose sem displasia epitelial; hiperplasia e hiperkeratose com displasia epitelial; carcinoma microinvasivo (com rompimento do limite da membrana basal do epitélio, porém limitada à lâmina própria) e carcinoma invasivo.

2.4. Imunoistoquímica

Para determinar a expressão dos focos GST-P+ e PCNA, foram utilizados anticorpo policlonal anti-GST-P (Glutathione-S-Transferase Placentária) e anticorpo monoclonal anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), segundo indicações de Chen & Lin (1996); Li et al. (1997) e Niwa et al. (2001). Deste modo, cortes de 5µm foram tratados com proteinase K por 30 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados anticorpos primários anti-GST-P (Dako, Lab.) e anti-PCNA (Dako, Corporation, clone PC-10), em temperatura ambiente por 24 horas, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos, corados com DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com Methyl green.

Os focos GST-P positivos foram contados em todos os campos examinados, considerando-se como foco, marcações presentes em células de todas as camadas epiteliais, conforme indicações de Chen & Lin (1996) e Li et al. (1997). O padrão de positividade celular para PCNA foi aferido segundo os critérios de Schwartz et al. (2000).

2.5. Análise Estatística

A avaliação dos focos de GST-P+ e PCNA, foi realizada pela análise de variância a um critério (ANOVA) e em todas as análises foram adotados o valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análise Macroscópica e Histopatológica da língua

Para os grupos expostos as concentrações de 10ppm e 50ppm da 4NQO, alterações macroscópicas na superfície da língua de alguns animais foram observadas a partir de 12 semanas, caracterizadas por manchas brancas (leucoplasias) e lesões exofíticas. Em 20 semanas de tratamento, foram também constatadas, manchas vermelhas (eritropias) e ulcerações. Os resultados da análise macroscópica estão representados na Tabela 1.

Histologicamente, lesões foram evidenciadas a partir de 12 semanas de tratamento com a 4NQO na concentração de 10ppm, representadas por hiperplasia e hiperqueratose sem displasia, na maior parte dos animais. Alguns animais deste grupo apresentaram diferentes graus de displasia e edema. Após 20 semanas, os animais apresentaram hiperplasia e hiperqueratose com ou sem displasia. Um caso de carcinoma microinvasivo e um caso de carcinoma *in situ* foram documentados. No grupo correspondente à concentração de 50ppm, em quatro semanas, um animal apresentou carcinoma escamoso microinvasivo e um animal apresentou carcinoma escamoso *in situ*. Com 12 semanas, a maior parte dos animais apresentou hiperplasia e hiperqueratose com ou sem displasia. Um animal apresentou carcinoma *in situ*. No grupo de 20 semanas, a maior parte dos animais apresentaram carcinoma invasivo, três animais apresentaram carcinoma microinvasivo e apenas um animal apresentou carcinoma *in situ*. Os resultados da análise morfológica estão sumarizados na Tabela 2 e Figura 2.

3.2. Análise Imunoistoquímica da língua

3.2.1. GST-P

No grupo experimental tratado com a 4NQO na concentração de 10ppm, imunomarcção para GST-P foram evidenciados a partir de quatro semanas. As alterações foram caracterizadas pela marcação de células isoladas ou em grupos distribuídos ao longo da camada basal do epitélio, considerados como pré-focos. Com 12 semanas, observou-se a presença de pré-focos em todos os animais e 09 sinais imunoistoquímicos para GST-P no epitélio histologicamente normal de 06 animais. Com 20 semanas, foi observada imunoreatividade do GST-P em epitélio histologicamente normal e/ou epitélio hiperplásico com aumento no número de focos por animal.

Quanto ao grupo correspondente à concentração de 50ppm, focos GST-P positivos pela imunoistoquímica foram observados a partir de quatro semanas. As alterações iniciaram-se com a presença de pré-focos, no entanto, observou-se focos de GST-P+ na maioria dos animais. Com 12 semanas, todos os casos apresentaram pré-focos ao longo do epitélio examinado. A maior parte dos animais apresentou sinal imunoistoquímico positivo para GST-P, em epitélio histologicamente normal e/ou em epitélio hiperplásico. Com 20 semanas, todos os casos apresentaram-se com imunoreatividade positiva para GST-P em epitélio hiperplásico e/ou displásico, constando aumento do número de animais com focos (incidência) e do número de focos por grupo (frequência) (Tabela 3 e Figura 3).

A análise estatística permite verificar que a diferença do número de focos de GST-P+ entre os grupos tratados foi estatisticamente maior quando comparado ao grupo controle, exceto para o grupo de quatro semanas com administração da 4NQO na

concentração de 10ppm. Nos grupos tratados com a concentração de 10ppm, verificou-se diferença significativa na média de focos dos grupos entre si. O número de focos GST-P+ nos grupos tratados com 50ppm da 4NQO, não apresentou diferença estatística quando comparados entre si. Os resultados imunoistoquímicos para GST-P+ estão apresentados na Figura 4.

3.2.2. PCNA

A expressão imunoistoquímica deste marcador foi predominantemente nuclear. No grupo controle, células PCNA-positivas foram observadas nas camadas basal e supra basal do epitélio. Nos grupos experimentais de quatro semanas expostos a 4NQO nas concentrações de 10 e 50ppm, o mesmo padrão de imunoreatividade foi detectado. Os grupos seguidos por 12 e 20 semanas de administração do agente cancerígeno na concentração de 10ppm, apresentaram aumento na imunoreatividade de células positivas para PCNA, quando comparados ao grupo controle. Nos períodos correspondentes à 12 e 20 semanas na concentração de 50ppm, as lesões potencialmente malignas e a maioria das células tumorais expressavam a proteína em questão (Figura 5). Os resultados morfométricos demonstraram que durante quatro semanas de tratamento em ambas concentrações do cancerígeno, nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi constatada, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, no período de 12 e 20 semanas, constatou-se significância em ambas concentrações em relação ao grupo controle (Figura 6).

4. Discussão

Os modelos de carcinogênese de média duração baseado no conceito de múltiplas etapas, têm sido freqüentemente utilizados para estudo do desenvolvimento de tumores malignos causados agentes ambientais, a investigação de estratégias para detecção de lesões precoces e para avaliação de fatores que influenciem no processo de carcinogênese.

Diversos modelos de carcinogênese bucal de média duração foram propostos. O mais comumente utilizado é a administração do DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) como agente cancerígeno, por meio de múltiplas aplicações tópicas na bolsa jugal de hamsters (Chen & Lin, 1996; Iida et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Chen et al., 2002). Entretanto, alguns autores questionaram a suscetibilidade desses animais em desenvolver carcinomas espinocelulares na mucosa bucal, devido à ausência do sistema linfóide nesta região. (Nauta et al., 1996). No presente estudo, ratos da linhagem Wistar apresentaram boa resposta as concentrações utilizadas, constituindo uma espécie adequada para o estudo da carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO. Além de outras características peculiares, como a facilidade de manuseio e disposição de dados quanto a sua biologia.

Baseado no processo de múltiplas etapas da carcinogênese química caracterizada por iniciação, promoção e progressão dos tumores, a administração crônica da 4NQO em água de beber induz o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares na língua de ratos que apresentam características histopatológicas similares às observadas no câncer bucal de seres humanos (Nishimura, 1999; Niwa et al., 2001; Okazaki et al., 2002; Vered et al., 2003). O resultado de ação da 4NQO pode ser obtido em algumas regiões

topográficas da mucosa bucal, sendo uma das mais freqüentes o dorso da língua (Nishimura, 1999; Nauta et al., 1996). Os resultados anátomo-patológicos deste trabalho demonstraram que a administração crônica da 4NQO induziu lesões brancas detectáveis macroscopicamente na maior parte dos animais expostos. Tais achados corroboram com aqueles descritos por Ohne et al. (1983) e Niwa et al. (2001), que também fizeram uso deste modelo.

A análise histopatológica das lesões demonstrou que a 4NQO em água de beber induziu alterações histopatológicas, caracterizadas por hiperplasia e hiperkeratose, displasia epitelial, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (Kramer et al., 1978). Os carcinomas apresentaram-se bem diferenciados com atipias celulares, pleomorfismo, mitoses freqüentemente encontradas, disqueratose de células isoladas e pérolas córneas. Cabe inferir que as lesões detectáveis do ponto de vista macroscópico foram correlatas aos achados microscópicos.

O tempo de desenvolvimento dos tumores bucais em ratos varia entre os protocolos utilizados. Neste estudo, optamos por utilizar o período de quatro, 12 e 20 semanas, seguindo as indicações de Kandakar et al. (1998), Prime et al. (1986) e Okazaki et al. (2002), nas concentrações de 10ppm (Vered et al, 2003) e 50ppm (Okazaki et al, 2002) de administração do agente cancerígeno. Os resultados deste trabalho indicam que a concentração de 50ppm mostrou-se efetiva para o estudo do desenvolvimento de carcinomas espinocelulares, uma vez que todos os animais apresentaram o *end point* previamente proposto no período de 20 semanas.

O estabelecimento definitivo sobre a patogenia do câncer bucal está além dos dados morfológicos quantitativos e qualitativos. Neste sentido, a busca por biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias

malignas é cada vez mais intensa. No presente trabalho foi avaliada a expressão de focos de GST-P+ e a proliferação celular por meio do PCNA, durante a administração da 4NQO associado às fases da tumorigênese.

Os resultados obtidos revelaram imunoreatividade aumentada para o GST-P, de acordo com a progressão da carcinogênese bucal em ratos Wistar, em ambas concentrações utilizadas, principalmente na de 10ppm, onde a incidência e a frequência de focos GST-P+ aumentaram progressivamente. Desta forma, analisando o padrão dos sinais imunoistoquímicos nos diferentes grupos, fica evidente o efeito dose-resposta. Em todos os grupos foram observadas alterações caracterizadas por expressão de GST-P em células isoladas ou em grupo marcadas ao longo da camada basal do epitélio. Tais alterações foram descritas por Chen & Lin (1996) e Li (1999) como sítios epiteliais propensos a futuros focos, designados como pré-focos. Focos GST-P+ em epitélio normal foram observados, caracterizando iniciação de células com ausência de alterações histopatológicas detectáveis pela coloração de hematoxilina e eosina (Li, 1999). Tais focos foram descritos como sítios epiteliais propensos para progressão de carcinomas (Li, 1999).

As células epiteliais possuem um elevado potencial mitótico e as agressões dirigidas contra esse tecido resultam em respostas de natureza proliferativa. Desta forma, o aumento no índice de proliferação celular pode ser um importante fator prognóstico dos tumores malignos (Pich et al., 2004). Segundo Coltera et al. (1992), em virtude da camada basal, ser constituída por células com grande capacidade de proliferação, a organização arquitetural bem definida do epitélio pavimentoso da mucosa bucal torna esse tecido ideal para a pesquisa dos sinais precoces de neoplasias, por meio da utilização de marcadores de proliferação, como por exemplo, o antígeno

nuclear de proliferação celular (PCNA). Sua grande vantagem é a possibilidade da utilização em tecidos fixados por formalina e incluídos em parafina.

Os resultados morfométricos demonstraram que durante quatro semanas de tratamento em ambas concentrações do cancerígeno, não foram detectadas alterações significativas. Constatando-se expressão de PCNA nas camadas basal e supra basal do epitélio, de acordo com as observações de Niwa (2001). No período de 12 e 20 semanas de tratamento com a 4NQO foi evidenciado significativo aumento no número de células imunopositivas para PCNA, em lesões hiperplásicas e displásicas. A positividade de marcação nos carcinomas espinocelulares também, foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Neste momento, o PCNA mostrou-se expresso em células de todas as camadas epiteliais. No entanto, não foram evidenciadas diferenças significativas entre as lesões potencialmente malignas e os carcinomas espinocelulares instalados. Os resultados obtidos, corroboram com os resultados descritos por Tanaka (2002) e Niwa (2001).

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram que focos GST-P+ podem ser considerados marcadores de lesões precoces no processo de carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO. Em contrapartida o PCNA pode ser utilizado para quantificar o índice de proliferação celular durante o processo de carcinogênese bucal murina.

5. Referências Bibliográficas

Capello F, [Rappa F](#), [David S](#), [Anzalone R](#), [Zummo G](#) (2003). Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res.* **23**: 1325-1331.

[Celis JE](#), [Madsen P](#), [Celis A](#), [Nielsen HV](#), [Gesser B](#) (1987). Ciclyn (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase δ) is a central component of the pathway (s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett.* **220**: 1-7.

Chen YK, Hsue SS, Lin LM (2002). Immunohistochemical demonstration of p73 protein in the early stages of DMBA-induced squamous-cell carcinogenesis in hamster buccal pouch. *Arch Oral Biol.* **47**: 695-699.

Chen YK, Lin LM (1996). Sequential expression of placental glutathione-S-transferase (GST-P) during DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* **25**: 388-394.

Coltrera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, Gown AM (1992). Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue.. *Am J Pathol.* **141**: 817-825.

De Camargo JLV, Tsuda H, Asamoto M, Tagawa Y, Wada S, Nagase S, et al (1993). Modifying effects of chemicals on the development of liver preneoplastic placental glutathione S-transferase positive foci in Analbuminemic and Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* **2**: 409-416.

Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trash DK, Hoffman HT (2002). Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A National Câncer Data Base report. *Head and Neck* **24**: 165-180.

Hayes JD, Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **30**: 445-600.

Iida K, Yamamoto M, Kato M, Yoshida K, Kurita K, Tatematsu M (1999). Strong expression of glutathione S-transferase placental form in early preneoplastic lesions and decrease with progression in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Cancer Lett* **135**: 129-136.

Kandakar V, Sawant SS, Reade PC (1998). Ultrastructural changes to the palatal mucosa of rats following the application of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) and vitamin C. *Oral Oncol.* **34**: 247-252.

Kaplan I, Engelberg J, Dayan D (2001). The effect of desalivation on 4-nitroquinoline 1-oxide induced tongue carcinogenesis: a morphometric study of nucleolar organizer regions. *J Oral Pathol Med.* **30**: 48-52.

Keller AZ (1967). Cirrhosis of the liver, alcoholism and heavy smoking associated with cancer of the mouth and pharynx. *Cancer* **20**: 1015-1022.

Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **46**: 518-539.

Li TJ (1999). Altered placental glutathione S-transferase foci as a tumor marker during rat lingual carcinogenesis. *Chin J Dent Res.* **2**: 49-53.

Li TJ, Hirayama Y, Kitano M (1997). Glutathione S-transferase π -class as a tumour marker in lingual preneoplastic and neoplastic lesions of rats and humans. *Virchows Arch.* **43**: 431-447.

[Lippman SM](#), [Lee JS](#), [Lotan R](#), [Hittelman W](#), [Wargovich MJ](#), [Hong WK](#) (1990). Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. *J Nat Cancer Inst.* **82**: 555-560.

Maccann MF, Macpherson LMD, Gibson J (2000). The role of the general dental practitioner in detection and prevention of oral cancer: a review of literature. *Dent Update* **27**: 404-408.

Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L (1993). Tobacco smoking, alcohol drinking and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* **72**: 1369-1375.

Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A (1996). Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck* **18**: 441-449.

Nishimura A (1999). Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis. *J Dent Res.* **78**: 1264-1269.

Niwa S, Ueno S, Shirasu R (2001). Alteration of pRB expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol.* **37**: 579-585.

Ohne M, Omori K, Kobayashi A, Sakurada Y, Sekigawa D, Mochizuki A, et al. (1983). Induction of squamous cell carcinoma in the oral cavity of rats by oral administrations of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in the drinking water. *Bull Tokyo Dent Coll.* **22**: 85-93.

Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G (2002). Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* **38**: 562-573.

Pich A, Chiusa L, Navone R (2004). Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Annals of Oncol.* **15**: 1319-1329.

Prime SS, Melamos D, Rosser T, Scully C (1986). Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. *J Oral Pathol.* **15**: 280-283.

Schwartz J, Baker V, Larios E, Desai D, Amin S (2004). Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* **40**: 611-623.

Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G (2000). Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol.* **36**: 225-235.

[Tanaka T](#), [Kawabata K](#), [Kakumoto M](#), [Matsunaga K](#), [Mori H](#), [Murakami A](#), et al (1998). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis* **19**: 425-431.

Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S, Mori H (2002). Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**: 1361-1367.

Tubiana M, Courdi A (1989). Cell proliferation kinetics in human solid tumours: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. *Radiother Oncol.* **15**: 1-18.

Van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA (1998). Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* **51**: 716-724.

Vered M, Daniel N, Hirshberg A, Dayan D (2003). Histomorphologic and morphometric changes minor salivary glands of the tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *Oral Oncol.* **39**: 491-496.

Zhang L, Moch D, Cameron R (1992). Development of glutathione S-transferase placental form (GST-P) stained foci during hamster buccal pouch mucosa carcinogenesis. *Cancer Lett* **64**: 241-247.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Paulo Roberto Cardoso e Mara Luiza Falaguera Ardanaz pela assistência técnica. Este trabalho teve suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n° 03/10030-2 e 02/09454-0 e Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN). Este estudo é a dissertação de mestrado de R.N.S.

Tabela 1. Análise macroscópica da superfície lingual dos ratos seguindo a administração da 4NQO.

¹Valores são expressos por animal.

	Normal Total	Mancha Branca	Mancha vermelha	Lesão exofítica	Ulceração	
Grupos						
Controle	10	0	0	0	0	10
10 ppm						
4	10	0	0	0	0	10
12	6	4	0	0	0	10
20	0	8	0	2	0	10
50 ppm						
4	10	0	0	0	0	10
12	0	7	0	3	0	10
20	0	5	1	2	2	10

Tabela 2. Análise histopatológica da superfície lingual dos ratos seguindo a administração da 4NQO.

¹Valores são expressos por animal.

	Mucosa Normal	Hiperplasia e hiperceratose s/ displasia	Hiperplasia e hiperceratose c/ displasia	<u>Displasia</u>	Carcinoma microinvasivo	Carcinoma in situ	Carcinoma invasivo	Total
Grupos								
Controle	0	0	0	0	0	0	0	10
10ppm								
4	9	1	0	0	0	0	0	10
12	5	3	0	2	0	0	0	10
20	5	2	1	0	1	1	0	10
50ppm								
4	8	0	0	0	1	1	0	10
12	1	3	3	2	0	1	0	10
20	0	0	0	0	3	1	6	10

Tabela 3. Número de animais com focos¹

Número total de focos/grupo²

Grupos	Incidência ¹			Frequência ²		
	4	12	20	4	12	20
Controle	0	0	0	0	0	0
(n=10) 10ppm	0	6	9	0	9	21
(n=10) 50ppm	8	7	10	30	25	38
(n=10)						

Figura 1

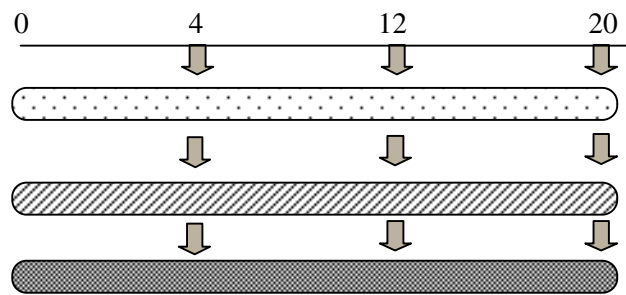


Figura 2

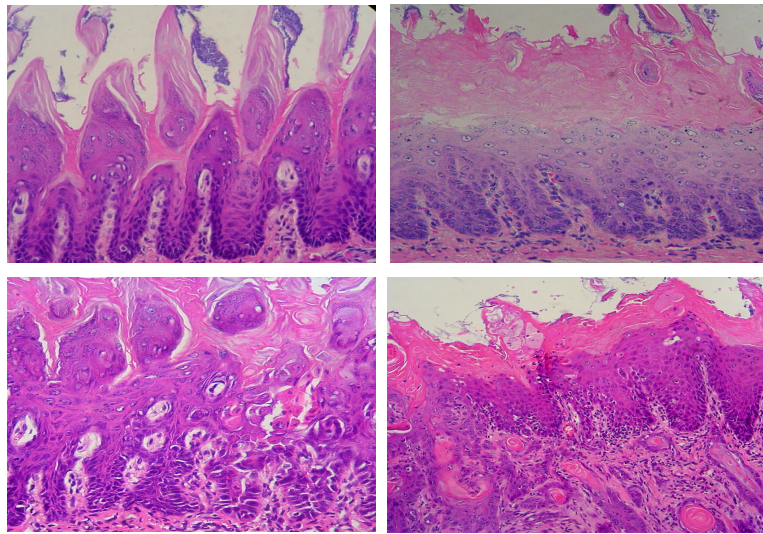


Figura 3

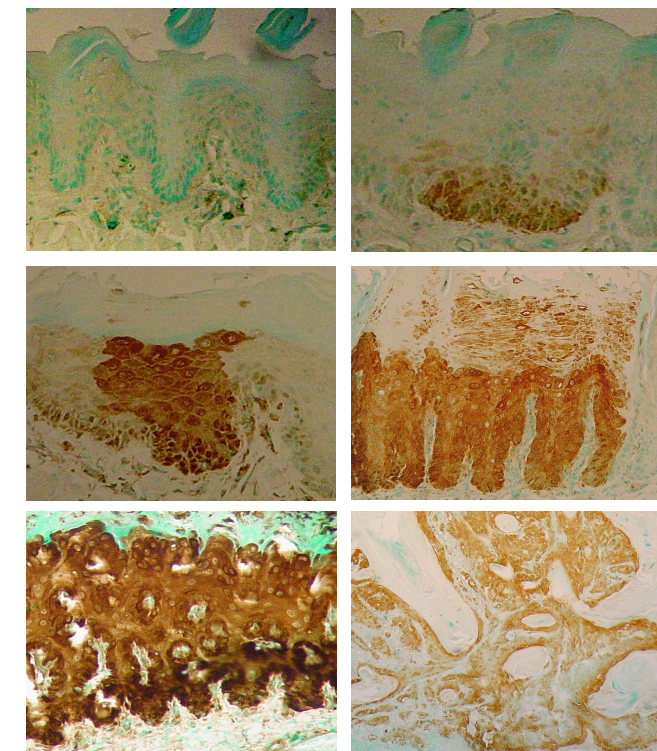


Figura 4

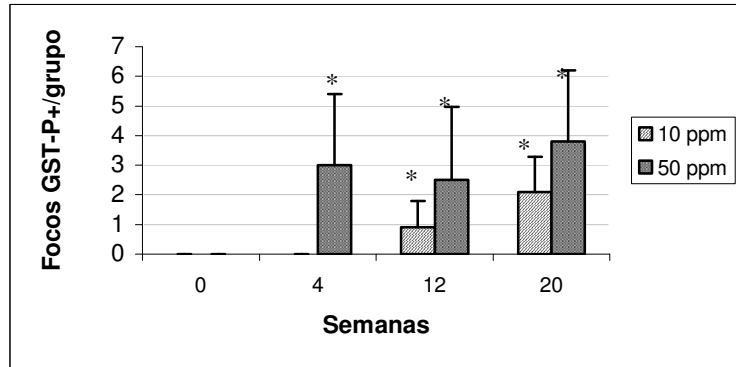


Figura 5

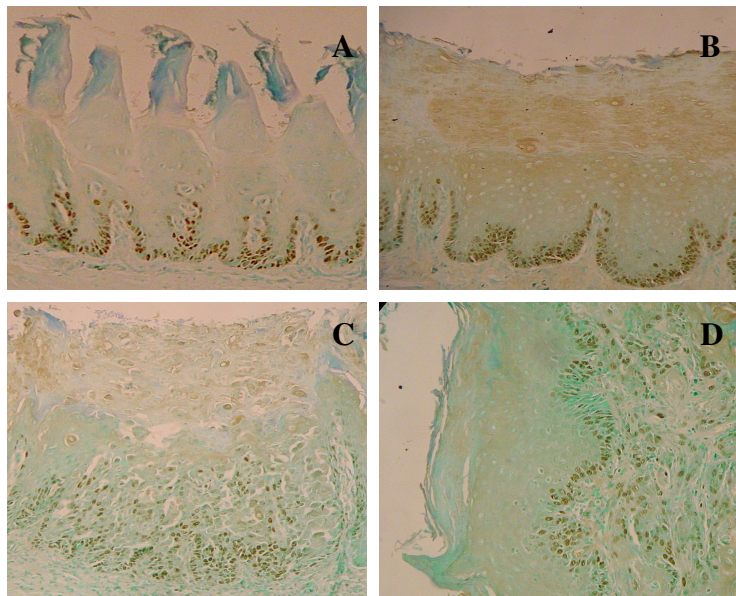
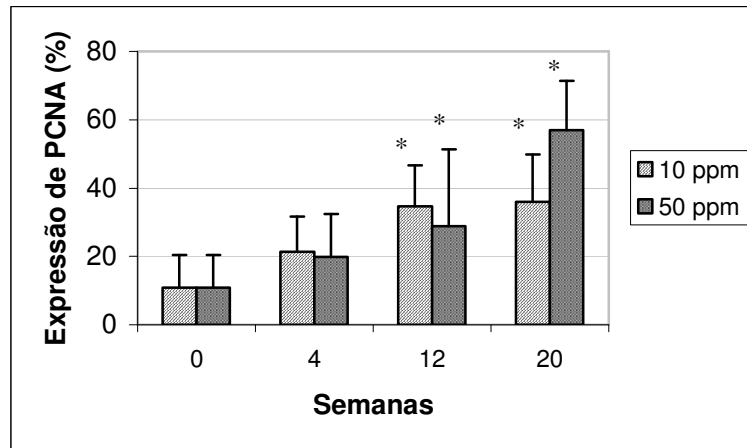


Figura 6



Legenda das Figuras

Figura 1: Delineamento Experimental





-  Grupo I - controle
-  Grupo experimental II – 10ppm 4NQO em água de beber
-  Grupo experimental III – 50ppm 4NQO em água de beber
-  Sacrifício

Figura 2: Análise Histopatológica da língua

Fotomicrografias do epitélio da mucosa bucal murina durante o curso da carcinogênese bucal induzida pela 4NQO (A) Grupo controle (B) Hiperplasia e hiperkeratose sem displasia. (C) Displasia (D) Carcinoma espinocelular bem diferenciado (Aumento 100x).

Figura 3: Imunoistoquímica para marcador GST-P

(A) Grupo controle (B) Pré-foco GST-P+ em células da camada basal e supra basal do epitélio (C) Foco GST-P+ instalado na mucosa histologicamente normal, após quatro semanas consecutivas de tratamento (D) Lesão hiperplásica com hiperkeratose sem displasia (E) Lesão hiperplásica com hiperkeratose com displasia (F) Imunorreatividade positiva para carcinoma espinocelular bem diferenciado (Aumento 100x).

Figura 4: Focos GST-P+/grupo

(*P<0,05 quando comparado ao grupo controle)

Os valores estão representados Média±D.P.

Figura 5: Imunoistoquímica para marcador PCNA

(A) Grupo controle (B) Hiperplasia e hiperkeratose sem displasia (C) Hiperplasia e hiperkeratose com displasia (D) Carcinoma espinocelular bem diferenciado (Aumento 100x).

Figura 6: Expressão de PCNA (%)

(*P<0,05 quando comparado ao grupo controle)

Os valores estão representados Média±D.P.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)