



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

RENAN SILVA SANTOS

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS APÓS
INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COM 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO

ARACAJU-SE

2025

RENAN SILVA SANTOS

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS APÓS
INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COM 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à conclusão do curso de Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Débora dos Santos
Tavares

ARACAJU-SE

2025

RENAN SILVA SANTOS

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS APÓS
INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COM 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à conclusão do curso de Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Autor: Renan Silva Santos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Débora dos Santos Tavares

ARACAJU-SE

2025

RENAN SILVA SANTOS

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA LÍNGUA DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DA CARCINOGENESE COM 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe
como requisito parcial à conclusão do curso de Medicina do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a Débora dos Santos Tavares.

Aprovada em: Aracaju-SE, ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Nota: _____

(1º EXAMINADOR)

Nota: _____

(2º EXAMINADOR)

Nota: _____

(3º EXAMINADOR)

ARACAJU-SE

2025

SUMÁRIO

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. A história do câncer	6
2. A Oncogênese	7
2.1 O 4NQO e a carcinogênese em camundongos	8
3. Lesões com potencial de malignização	9
3.1 Definição.....	9
3.2 Fatores de risco	10
3.3 Características clínicas	11
3.4 Diagnóstico e tratamento	12
4. Carcinoma de células escamosas oral em humanos.....	13
4.1 Definição, etiologia e prognóstico.....	13
4.2 Características clínicas, perfil epidemiológico e diagnóstico.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
II– NORMAS PARA PUBLICAÇÃO.....	22
III - ARTIGO ORIGINAL.....	31
1. INTRODUÇÃO	36
2. METODOLOGIA	37
2.1 Comitê de ética e pesquisa.....	37
2.2 Carcinógeno, Indução e Eutanásia.....	37
2.3 Preparo histológico das peças.....	38
2.4 Análise histológica	38
2.5 Captura de imagens das lâminas.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Epitélio normal e grupos controle	40
3.2 Experimento durante 14 semanas	41
3.3 Experimento durante 23 semanas	43

3.4 Tempo de indução, tempo de observação e concentração de 4NQO	44
4. CONCLUSÃO	48
5. CONTRIBUIÇÕES.....	48
6. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES.....	48
7. FONTES DE FINANCIAMENTO.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
9. ANEXOS	51

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A história do câncer

O câncer não é uma doença descoberta na modernidade, Hipócrates, patriarca da ciência médica, já o descreverá como *Karkinos*, que no grego significa caranguejo, devido ao aspecto da célula e tecidos avistados pelo pai da medicina, que viveu em meados de 460 e 377 a.C. Essa patologia engloba uma diversidade de tipos e subtipos que têm em comum a multiplicação celular desordenada, o câncer já foi encontrado até mesmo no estudo de múmias egípcias que remontam a mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA, 2020).

Desde a antiguidade, o câncer sempre foi associado a dor e ao sofrimento. Inicialmente, era designado como uma mazela que era derivada de um desequilíbrio entre os fatores orgânicos com fatores ambientais e hereditários. No Brasil, no início do século XX, o câncer era visto como uma doença contagiosa (semelhante a lepra e a tuberculose: doenças infectocontagiosas que tiveram grande incidência nesse momento da história) (TEIXEIRA *et al.*, 2012). A visão que se tinha inicialmente a respeito do câncer era de uma doença incurável, porém com baixa incidência. Ainda no início do século XX, algumas medidas médicas surgiram na tentativa de combate ao câncer (meados de 1920), porém somente cerca de 20 anos após essa doença foi entendida como um problema de saúde pública. Com isso, houve uma maior efetividade de tratamentos e modernização das terapêuticas existentes na época (TEIXEIRA e NETO, 2020).

Devido à população mais pobre ser mais exposta a doenças com grande mortalidade, como a tuberculose e a lepra, aliado à precária assistência à saúde nessa classe social, pouco se sabia da incidência de outras doenças, como por exemplo o câncer, nesses indivíduos. Por outro lado, a população mais rica além de ser menos exposta a condições que favorecessem o contágio com essas doenças infecciosas altamente letais na época, havia um maior acesso aos serviços de assistência à saúde, logo as enfermidades eram investigadas mais a fundo e alguns diagnósticos diferenciais poderiam ser aventados. Desse modo, levando em consideração todo esse contexto social, levou ao favorecimento da equivocada impressão de que o câncer era uma doença predominante, ou pode-se dizer praticamente exclusiva, da classe abastada da época (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Ou seja, infere-se que as pessoas mais pobres também desenvolviam o câncer, porém, infelizmente, eram subdiagnosticadas e consequentemente subtratadas.

2. A Oncogênese

Diferente das células normais em que há um controle da divisão celular, as células cancerígenas crescem de forma desordenada e possuem bloqueios que evitam sua apoptose (INCA, 2020). Mutações em genes específicos das células humanas são responsáveis por tornar a célula cancerígena resistente ao controle pelo sistema imunológico. Embora tenha-se avançado bastante na pesquisa sobre oncogênese nos últimos anos, ainda há uma lacuna no que diz respeito a frequência exata de mutações na célula, bem como o número preciso de divisões celulares necessárias para dar origem ao câncer propriamente dito (SARASIN, 2003). A oncogênese, sistema extremamente complexo, pode acontecer tanto devido à falha nos mecanismos regulatórios, quanto devido às anormalidades no ciclo celular que ocorrem de forma espontânea ou em resposta a fatores extrínsecos, mesmo que sem alterações genéticas prévias (URIBE *et al.*, 2022).

Um ponto fundamental na compreensão da oncogênese é o gene TP53 visto que aproximadamente 50% dos cânceres humanos não expressam totalmente a proteína p53 ou possuem esse gene inativo devido a mutações. O gene TP53 é ativado por estresse celular, com subsequentes danos ao DNA, sendo as quinases ATM, ATR, Chk1 e Chk2 responsáveis por tal sinalização (EFEYAN e SERRANO, 2007; LOWE, 1999). O gene Mdm2 realiza a síntese da proteína MDM2, o produto desse gene possui a capacidade de inativar de forma direta a p53, o que proporciona, em células normais, uma baixa quantidade dessa proteína, tendo em vista que em condições habituais ela é degradada logo após sua síntese (KLUMB e JÚNIOR, 2002). Quando ocorre a detecção de estresse celular, a degradação direta da p53 pela MDM2 é interrompida, pois ocorre a inativação do gene Mdm2, levando a um aumento da quantidade de p53 no meio intracelular e consequentemente aumentando a sua atividade, desse modo ocasionando a apoptose ou a senescência na célula defeituosa (EFEYAN e SERRANO, 2007; LOWE, 1999).

O dano ao DNA foi o primeiro tipo de estresse celular descoberto que ativa a p53, logo essa proteína tornou-se conhecida como a “guardiã do genoma”, pois viu-se que ela evitava a proliferação de células com atipias nucleares, proliferação essa que é fundamental no desenvolvimento de neoplasias. Além disso, a proteína p53 apresenta um importante papel no que diz respeito a regulação da ação dos oncogenes, pois quando ocorre a sinalização oncogênica gera um “*feedback*” positivo na ativação do gene TP53 aliado a uma diminuição da degradação da proteína sintetizada por esse gene pelas vias inibitórias. A via de ativação da

p53 utilizada em tal processo é decorrente da ativação do gene *ADP-ribosylation factor 1* (ARF1) que aumenta a atividade do gene TP53 e com isso ocasiona um aumento expressivo da quantidade de p53 sintetizada. Consequentemente ao aumento da quantidade da p53 no meio intracelular, ocorre uma potencialização da sua função de supressão tumoral (EFEYAN e SERRANO, 2007; LOWE, 1999). Portanto, ambos os meios de sinalização celular acarretam no aumento expressivo da quantidade intracelular de p53 e com isso ocorre a supressão tumoral, em condições de normalidade dos sistemas de proteção celular.

2.1 O 4NQO e a carcinogênese em camundongos

O tecido que reveste a língua dos camundongos possui partes recobertas com epitélio do tipo escamoso (pavimentoso) estratificado queratinizado composto por três camadas com características celulares distintas (CIENA et al., 2013). Esse tipo de epitélio também é encontrado em praticamente todo o revestimento do dorso lingual na língua humana (AZEVEDO et al., 2016). A carcinogênese química ocorre em basicamente três etapas: iniciação, promoção e progressão (RIVERA MARTÍNEZ, 2012). Na fase de iniciação ocorre danos irreversíveis ao DNA da célula, com isso adquire o potencial cancerígeno; já na promoção os agentes indutores de mitose levam a proliferação das células já iniciadas (STEVENS & LOWE, 2001). Na fase de progressão, que depende da persistência da fase de promoção, as células apresentam novas mutações e, com isso, ocorre uma proliferação celular desenfreada das células iniciadas (mutadas) ocorrendo autonomia dos seus processos mitóticos e formação da neoplasia maligna (RIVERA MARTÍNEZ, 2012; RIBEIRO; GRILLI; SALVADORI, 2008). Algumas substâncias carcinogêneas podem agir em mais de uma fase da carcinogênese, sendo esses considerados carcinógenos completos, o 4NQO é classificado como um deles (VERED et al., 2004; STEVENS & LOWE, 2001). Além disso, o 4NQO possui tanto o potencial de induzir lesões potencialmente malignas, quanto a capacidade de promover a indução de carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Tais lesões, possuem uma similaridade de cerca de 94% com as lesões decorrentes do tabagismo, que é o principal fator predisponente de CCEO em humanos (GLATHAR et al., 2023; LANÇA et al., 2023; FRANCO et al., 2023).

3. Lesões com potencial de malignização

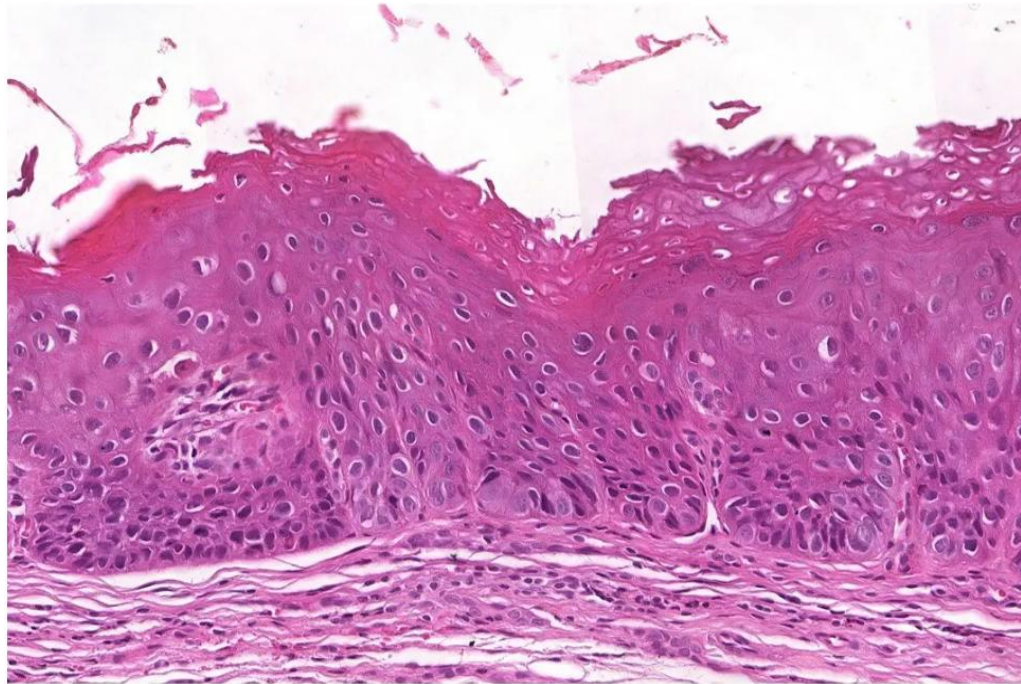
3.1 Definição

As lesões com potencial de malignização são assim denominadas por apresentarem alterações teciduais com potencial de transformação em câncer, no caso da cavidade oral do epitélio de revestimento. Tais lesões possuem grande relevância clínica, pois se diagnosticadas e tratadas corretamente antes que ocorra a malignização o prognóstico do paciente é melhorado. As lesões potencialmente precursoras de malignidade da cavidade oral são classificadas de acordo com as características clínicas e histopatológicas, sendo as principais a leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia/eritroleucoplasia (SILVA; AMARAL; BULHOSA, 2010; INCA, 2022).

Schwimmer (1877) descreveu a leucoplasia como uma lesão branca encontrada na língua. Atualmente, a OMS (2005) não discorda da descrição original, apenas acrescenta que se considera leucoplasia a lesão branca não removível por raspagem que não se caracteriza clinicamente ou patologicamente a outra condição já conhecida, ou seja, configurando um diagnóstico de exclusão (NEVILLE e DAY, 2002; BARNES *et al*, 2005). Já a eritroplasia é semelhante no que diz respeito ao diagnóstico, logo, a lesão somente pode ser assim caracterizada excluindo-se demais patologias orais semelhantes, sendo descrita como uma lesão vermelha que não tem clínica ou arranjo estrutural semelhante a condições conhecidas (LOEB e EVRARD, 2008).

O conceito histológico de displasia epitelial refere-se a presença de células com atipias (anomalias no formato celular, atividade mitótica anormal, etc.), como visto na figura 1, nas camadas do epitélio e alterações no arranjo epitelial, sendo graduada em: displasia leve (atinge terço inferior do epitélio), displasia moderada (atinge o terço médio do epitélio), displasia severa (acomete mais de dois terços do epitélio), (WARNAKULASURIYA *et al*., 2001; WARNAKULASURIYA *et al*., 2008; BARNES *et al*, 2005).

Figura 1: Imagem microscópica de displasia epitelial em epitélio da cavidade oral (núcleos hipercromáticos, mitoses atípicas, polimorfismo celular e nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma).



Fonte: GOMEZ, 2024

As leucoplasias, em especial as verrucosas e multifocais, apresentam displasias e com o passar do tempo, cerca de 50% a 100% dos focos displásicos evoluem para carcinoma *in situ* se não tratadas corretamente, sendo a lesão precursora que mais evolui para carcinoma de células escamosas oral. No que diz respeito as eritroplasias, cerca de 90% apresentam displasias, carcinoma *in situ* e/ou carcinoma invasivo nas biópsias realizadas. As displasias, de um modo geral, independente da área corporal afetada, apresentam a tendência de malignização. Nas patologias pré-cancerosas orais não é diferente, sendo corriqueiro observar a evolução dos graus de displasia e, posteriormente, em neoplasia maligna (WOO, 2024).

3.2 Fatores de risco

As lesões com potencial de malignização têm como características para seu desenvolvimento fatores externos, como o uso de álcool e tabaco, o que é agravado quando esse uso ocorre de forma concomitante. Outros fatores também podem estar associados ao desenvolvimento destas lesões. Um fator importante é a exposição a luz solar (podendo provocar lesões em lábio), outro é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), vírus esse que tem o potencial de provocar o surgimento de lesões precursoras de câncer por provocar alterações nas proteínas que regulam o ciclo celular. Além disso, algumas comorbidades e condições podem favorecer o surgimento dessas lesões como, por exemplo, imunossupressão

(seja induzida por fármacos, como nos transplantados; seja devido a doenças que afetem a imunidade, como por exemplo a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana), idade, tratamento antineoplásico, histórico pessoal ou familiar de câncer, principalmente de cabeça e pescoço (WOO, 2024).

3.3 Características clínicas

As leucoplasias podem ser clinicamente descritas como uma lesão branca em cavidade oral, sendo mais comum em língua, palato mole, assoalho da boca ou mucosa jugal, de tamanho variável, como visto na figura 2, que acomete homens e mulheres acima de 45 anos. Tais lesões têm como características limites precisos com bordas irregulares. Podem exibir um padrão de elevação da superfície uniforme, entretanto há casos que apresentam irregularidades, superfície heterogênea, semelhante a um padrão verrucoso. Geralmente são assintomáticas e podem variar seu tamanho de milímetros a centímetros (AZEVEDO *et al.*, 2021; PIRES *et al.*, 2019; WARNAKULASURIYA, 2018; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2021; INCA, 2022).

Ademais, no que diz respeito as eritropalias, geralmente são descritas como lesões vermelhas com limites imprecisos, de bordas regulares. (WARNAKULASURIYA, 2018; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2021; INCA 2022). Semelhante às leucoplasias, no quesito localização, podem ser encontradas em qualquer parte da cavidade oral, sendo mais frequente em língua, palato mole, assoalho da boca e região retromolar. Diferente das leucoplasias, estas lesões podem estar associadas a sintomas como dor/ardência local (AZEVEDO *et al.*, 2021; WARNAKULASURIYA, 2018; PIRES *et al.*, 2019; INCA 2022).

Figura 2: Imagem clínica de leucoplasia heterogênea de aparência nodular em mucosa jugal, de forma mais precisa em comissura labial.



Fonte: GOMEZ, 2024.

Já as leucoeritroplasias ou eritroleucoplasias, que pode ser vista na figura 3, mesclam as características das leucoplasias e eritroplasias, e sua nomenclatura é dada de acordo a coloração predominante na lesão (se predomina o branco: leucoeritroplasias; se predomina o vermelho: eritroleucoplasias). Estas podem, do mesmo modo, acometer qualquer sítio da cavidade oral, sendo mais comum em língua e mucosa jugal (AZEVEDO *et al.*, 2021; WARNAKULASURIYA, 2018; PIRES *et al.*, 2019; INCA 2022).

Figura 3: Lesão exofítica e leucoeritroplásica em bordo lateral de língua.



Fonte: INCA, 2022 (cedida por Águida Aguiar Miranda).

3.4 Diagnóstico e tratamento

As eritroplasias e as leucoplasias, no que diz respeito ao diagnóstico clínico, além da descrição de serem manchas vermelhas e brancas, respectivamente, na cavidade oral, não serão destacáveis à raspagem. Reforça-se a tese de que por serem um diagnóstico de exclusão, não são caracterizadas clínica ou patologicamente como outra afecção oral já conhecida e de forma bastante frequente apresentam focos displásicos (WOO, 2024; PIRES *et al.*, 2019; WARNAKULASURIYA, 2018; WARNAKULASURIYA, 2019; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2021; INCA 2022). Do mesmo modo, para o diagnóstico de leucoeritroplasias ou eritroleucoplasias, as lesões devem mesclar suas características, ou seja, exibirem partes vermelhas e brancas que não são destacáveis à raspagem e não são semelhantes a outros diagnósticos já conhecidos, podendo ou não apresentar focos de displasia na análise microscópica da peça biopsiada (WOO, 2024; INCA, 2022).

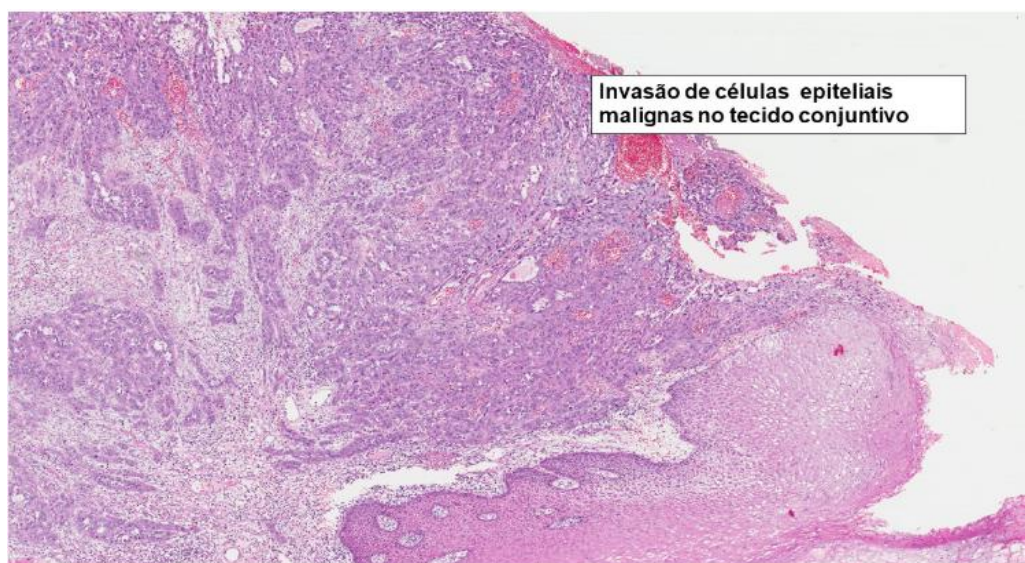
O tratamento dessas lesões é frequentemente realizado pelo cirurgião dentista especializado na área bucomaxilofacial, que através de métodos cirúrgicos, medicamentosos, entre outros, remove esses tecidos afetados impedindo o avanço dessas lesões. A retirada desse tecido também tem a proposta de confirmar o diagnóstico por meio da análise histopatológica e possibilita guiar a terapêutica de uma forma coerente à patologia da lesão, otimizando, assim, as chances de sucesso do tratamento (SILVA e JÚNIOR, 2023).

4. Carcinoma de células escamosas oral em humanos

4.1 Definição, etiologia e prognóstico

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é definido pela presença de células epiteliais exibindo atipias em seus núcleos associado a uma ruptura da membrana basal epitelial, o que possibilita a invasão do tecido conjuntivo subjacente por essas células alteradas neoplásicas, como visto na figura 4 (VINCENT-CHONG *et al*, 2018). Ademais, tal definição também encontra respaldo científico no que propõe a OMS (2005) para que seja dado o referido diagnóstico (BARNES *et al*, 2005). Atualmente, já se sabe que os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia é o uso de tabaco, o etilismo, a infecção pelo papilomavirus humano (HPV) e a exposição à radiação solar. Entretanto, também há relatos na literatura de que pacientes do sexo masculino, com idade avançada, baixo grau de escolaridade, portadores de comorbidades, possuem um maior risco para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia (FRANCO *et al*, 2023).

Figura 4: Carcinoma espinocelular em epitélio de revestimento da cavidade bucal.



Fonte: TIBURSKI; PINHEIRO; ANDERSON, 2024.

Os principais locais da cavidade oral onde essas neoplasias podem se desenvolver incluem a língua (como visto na figura 5), o assoalho bucal, o palato mole, a gengiva, a mucosa jugal, o palato duro e a orofaringe (FRANCO *et al*, 2023). Dentre os tumores localizados na cavidade oral, a alta prevalência do CCEO (também denominado de carcinoma espinocelular ou ainda carcinoma epidermóide) chama atenção, tendo sua incidência de aproximadamente 95% do total de casos (MONTORO *et al*, 2008). Além disso, sabe-se que a sobrevida global das pessoas acometidas por tal patologia é de aproximadamente 39% em 5 anos. Uma menor taxa sobrevida é observada nos casos nos quais há comprometimento das margens na biópsia excisional da lesão, pacientes que já apresentam metástases e naqueles que necessitaram de radioterapia após excisão da lesão, ou seja, quanto mais avançado o tumor, menor a sobrevida (MONTORO *et al*, 2008).

A presença de metástases nos linfonodos possui grande relevância prognóstica com o risco de mortalidade aumentando em cerca de 8 vezes quando a neoplasia está associada a metástase para linfonodo lingual (LEE *et al*, 2022). O estudo realizado por LEE *et al*. (2022), que incluiu 51 pacientes com CCEO, foram encontradas metástases em 9 e o risco estimado de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 22,2% em pacientes com metástase para o linfonodo lingual e nos que não ocorreram metástases (42 pacientes) a sobrevida livre da doença em 5 anos foi de 85,7% ($P < 0,001$).

4.2 Características clínicas, perfil epidemiológico e diagnóstico

Em relação às suas manifestações clínicas, o carcinoma epidermóide oral possui alguns sinais e sintomas que podem indicar a presença dessa lesão na cavidade oral, como úlceras orais que não cicatrizam em até 15 dias, presença de manchas vermelhas, brancas ou mistas em língua, palato mole, mucosa jugal, nodulações em pescoço e rouquidão persistente. Geralmente, a população mais cometida pelo CCEO são homens fumantes e etilistas que têm mais de 65 anos de idade e as lesões apresentam geralmente uma superfície rugosa com crescimento exofítico (visto na figura 6), podendo ocorrer em diversos locais da cavidade oral e da orofaringe (SOUSA *et al.*, 2023). Em um estudo retrospectivo de 303 prontuários de pacientes que foram submetidos ao tratamento oncológico no Hospital São Vicente de Paulo (RS/Brasil), no período de 1993 a 2008, KUZE *et al*. (2021) observaram o perfil epidemiológico desses pacientes acometidos por CCEO e concluíram que 84,7% dos pacientes possuíam histórico de etilismo e/ou tabagismo, sendo 88,4% homens, e o local de maior ocorrência de lesão foi a língua (45,5%). Ademais, também foi observado que o

principal fator de mau prognóstico é o diagnóstico tardio, em estágios mais avançados (estádios III e IV) (KUZE *et al.*, 2021).

O papel do profissional da saúde no diagnóstico precoce do câncer de boca é de extrema importância para a descoberta dessas lesões ainda em estágio inicial, o que confere um melhor prognóstico para o paciente, tendo em vista que quanto mais avançado o estágio da doença no diagnóstico pior a evolução do paciente (INCA, 2022; KUZE *et al.*, 2021; MONTORO *et al.*, 2008). Para que ocorra a investigação diagnóstica em casos de lesões suspeitas é preciso que os profissionais da saúde, principalmente a Atenção Primária, estejam atualizados sobre o tema e identifiquem sinais/sintomas sugestivos na anamnese e exame físico. Todos os casos suspeitos devem ser encaminhados para a realização de biópsias, sendo o cirurgião dentista o responsável pela realização ou o encaminhamento dos pacientes para que seja realizado esse procedimento (INCA, 2022). Algumas das indicações de biópsia, segundo o INCA (2022), são: lesões que apresentam mudança da coloração de forma persistente e significativa (brancas, vermelhas ou mistas), lesões potencialmente malignas que apresentem progressão clínica, lesões persistentes há 2 semanas ou mais sem etiologia definida, lesão refratária a conduta clínica (INCA, 2022).

Figura 5: Carcinoma de células escamosas localizado na borda lateral esquerda da língua



Fonte: INCA, 2022 (cedida por Héilton Spindola Antunes).

Figura 6: Carcinoma de células escamosas na borda lateral esquerda da língua e no rebordo gengival inferior.



Fonte: INCA, 2022 (cedida por Héilton Spindola Antunes).

4.3 Tratamento

O tratamento para os tumores de cabeça e pescoço, em especial para os carcinomas de células escamosas orais, pode envolver cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Recomenda-se a cirurgia nos estágios iniciais da neoplasia, tendo uma proposta curativa. A quimioterapia combinada com a radioterapia é geralmente reservada para casos mais avançados, quando ocorre acometimento de áreas que podem gerar um prejuízo estético importante, em casos de riscos de disfunção ou quando há a necessidade de preservação do órgão. Também existe a possibilidade da quimioterapia associada a radioterapia quando o CCEO está localmente avançado ou irressecável cirurgicamente (SOUZA; CARVALHO; MIRANDA, 2023). Desse modo, torna-se fundamental a exploração do espaço sublingual bem como a pesquisa do acometimento linfonodal tanto no intraoperatório quanto no pré-operatório, tendo em vista a menor taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos nos pacientes com acometimento do linfonodo lingual por metástase (LEE *et al*, 2022).

No que diz respeito às recidivas do tumor, após a realização do tratamento inicial, a taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos é menor quanto mais cedo for a recidiva (CHEDID; FRANZI, 2008). Em um estudo retrospectivo realizado por CHEDID; FRANZI (2008), foram analisados 276 casos com diagnóstico de carcinoma espinocelular em cavidade bucal e em orofaringe, desses, 127 pacientes desenvolveram recidivas loco-regional. Ainda, dos pacientes em que houve recidiva, 89 pacientes foram submetidos a tratamento de resgate, e a taxa de sobrevida livre de doença em cinco anos foi proporcional ao tempo em que ocorreu a recidiva: quando nos primeiros 6 meses do tratamento inicial a taxa foi 13%; quando ocorreu recidiva após 12 meses essa taxa subiu pra 48%. Nas recidivas tumorais, o principal sintoma descrito pelo paciente é a dor, sendo pouco frequente os pacientes que se mantêm assintomáticos na vigência do retorno da doença (AMAR *et al*, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAR, Ali *et al*. Recidivas locais após tratamento cirúrgico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágio avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 32, p. 60-63, 2005.

AZEVEDO, Alexandro Barbosa de *et al*. Oral leukoplakia, leukoerythroplakia, erythroplakia and actinic cheilitis: analysis of 953 patients focusing on oral epithelial dysplasia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 50, n. 8, p. 829-840, 2021.

AZEVEDO, Ricardo Bentes et al. Histologia da cavidade oral. **Sistema digestório integração básico-clínica [livro eletrônico] / Reinaldo Barreto Oriá, Gerly Anne de Castro Brito (org.)**. São Paulo: Blucher, v. 3, 2016.

BARNES, Leon *et al*. (Ed.). **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC, 2005.

CHEDID, Helma Maria; FRANZI, Sergio Altino. Assessment of disease-free survival in patients with loco-regional recurrence of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx submitted to salvage treatment. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 54, n. 2, p. 127-131, 2008.

CIENA, Adriano Polican et al. Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* L innaeus, 1766). **Journal of Anatomy**, v. 223, n. 2, p. 152-158, 2013.

EFEYAN, Alejo; SERRANO, Manuel. p53: guardião do genoma e policial dos oncogenes. **Ciclo celular**, v. 6, n. 9, p. 1006-1010, 2007.

FRANCO, Bárbara Fortunato Andrade *et al.* Principais fatores de risco e predisponência para o desenvolvimento do carcinoma oral de células escamosas. **Libertas Odontologia**, v. 2, n. 1, 2023.

GLATHAR, Alexandra Ruth et al. A systemic and integrated analysis of p63-driven regulatory networks in mouse oral squamous cell carcinoma. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 446, 2023.

GOMEZ, Ricardo Santiago. **Leucoplasia**. Disponível em: <https://patologiabucal.com.br/portfolio-item/leucoplasia/>. Acesso em: 06 dez. 2024.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Ministério da Saúde. **Diagnóstico precoce do câncer de boca**. Rio de Janeiro, 2022.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.

KLUMB, Claudete E.; JÚNIOR, Geraldo B. Cavalcanti. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 111-125, 2002.

KUZE, Luana Soares *et al.* Perfil epidemiológico de pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide oral em Passo Fundo, Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 4, 2021.

LANÇA, Maria Leticia de Almeida et al. Protocolo para estudo da progressão da leucoplasia oral em modelo pré-clínico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 51, n. Especial, p. 0-0, 2023.

LEE, Oh Hyeong et al. Prognostic significance of the metastatic lingual lymph node in oral tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 80, n. 3, p. 553-558, 2022.

LOEB, I.; EVRARD, L. Precancerous and cancerous lesions of the oral cavity. **Revue Medicale de Bruxelles**, v. 29, n. 4, p. 267-272, 2008.

LOWE, S. W. Ativação de p53 por oncogenes. **Câncer relacionado ao sistema endócrino**, v. 6, n. 1, p. 45-48, 1999.

MONTORO, José Raphael de Moura Campos *et al.* Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 861-866, 2008.

NEVILLE, Brad W.; DAY, Terry A. Oral câncer and precancerous lesions. **CA: a câncer journal for clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

OLIVEIRA, Adrienne Vitória Silva; SIQUEIRA, Viviane Silva. Principais desordens orais potencialmente malignas e suas características clínicas. **Comissão organizadora da X Jont**, - ED. 51. VOL. 1, 2024.

PIRES, Fábio Ramôa et al. Oral potentially malignant disorders: clinical-pathological study of 684 cases diagnosed in a Brazilian population. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 25, n. 1, p. e84, 2019.

RIBEIRO, Daniel A.; GRILLI, Daniela G.; SALVADORI, Daisy MF. Genomic instability in blood cells is able to predict the oral cancer risk: an experimental study in rats. **Journal of molecular histology**, v. 39, p. 481-486, 2008.

RIVERA MARTÍNEZ, César Andrés. 4NQO carcinogenesis: A model of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 1, p. 309-314, 2012.

SARASIN, Alain. Uma visão geral dos mecanismos de mutagênese e carcinogênese. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 2-3, p. 99-106, 2003.

SCHWIMMER, Ernö. Die idopathisches Schleimhaut-plaques der Mundhohle (leukoplakia buccalis). **Arch Dermatol Syphilol**, v. 9, p. 511-570, 1877.

SILVA, Bruno Vinicius pereira da; JÚNIOR, Walter Paulesini. A Importância da Prevenção e o tratamento do câncer benigno de boca pelo Cirurgião Bucomaxilofacial. **Revista Primeira Evolução**, São Paulo, Brasil, v. 1, n. 47, p. 69–75, 2023.

SILVA, Cátia Carvalho; AMARAL, Barbas do; BULHOSA, José Frias. Carcinoma espinocelular da língua–fatores de risco e importância do reconhecimento de lesões pré-malignas. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2010.

SOUSA, Lucas Farias *et al.* Aspectos clínicos do carcinoma epidermóide oral: uma revisão integrativa da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 3, p. 11710-11726, 2023.

SOUZA, VG de; CARVALHO, A. de L.; MIRANDA, C. S. S. Protocolo Unificado para o Tratamento das Neoplasias Malignas Não Hematológica. [Internet]. **INCA–Instituto Nacional de Câncer**, 2023.

STEVENS, A. & LOWE, J. Anatomia Patológica. 2 ed. Barcelona, **Elsevier**, pp.97-9, 2001.

TEIXEIRA, Luiz Antônio da Silva *et al.* **O câncer no Brasil: passado e presente**. Outras Letras, 2012.

TEIXEIRA, Luiz Antônio; NETO, Luiz Alves Araújo. Câncer de mama no Brasil: medicina e saúde pública no século XX. **Saúde e Sociedade**, v. 29, p. e180753, 2020.

TIBURSKI, Gabriel; PINHEIRO, Carlos; ANDERSON, Douglas. **Neoplasias**. Disponível em: Patologia. Disponível em: http://patoestomatoufrgs.com.br/patologia-bucal/2_neoplasias.php. Acesso em: 06 dez. 2024.

URIBE, Daniel *et al.* Adaptar-se para persistir: microambiente do glioblastoma e regulação epigenética na plasticidade celular. **Biology**, v. 11, n. 2, pág. 313, 2022.

VERED, M.; YAROM, N.; DAYAN, D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncol**, v.41, p.33739, 2004.

VINCENT-CHONG, VK *et al.* Impacto da idade na progressão da doença e microambiente no câncer bucal. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 11, pág. 1268-1276, 2018.

WARNAKULASURIYA, Saman *et al.* Distúrbios orais potencialmente malignos: Um relatório de consenso de um seminário internacional sobre nomenclatura e classificação, convocado pelo Centro Colaborador da OMS para o Câncer Bucal. **Doenças bucais**, v. 27, n. 8, p. 1862-1880, 2021.

WARNAKULASURIYA, Saman *et al.* Sistemas de classificação da displasia epitelial oral: valor preditivo, utilidade, pontos fracos e margem para melhorias. **Jornal de Patologia oral e Medicina**, v. 37, n. 3, pág. 127-133, 2008.

WARNAKULASURIYA, Saman. Características clínicas e apresentação de distúrbios orais potencialmente malignos. **Cirurgia oral, medicina oral, patologia oral e radiologia oral**, v. 125, n. 6, p. 582-590, 2018.

WARNAKULASURIYA, Saman. Histological grading of oral epitelial dysplasia: revisited. **The Journal of Pathology**, v. 194, n. 3, p. 294-297, 2001.

WARNAKULASURIYA, Saman. Lesões brancas, vermelhas e mistas da mucosa oral: uma abordagem clínico-patológica para o diagnóstico. **Periodontologia** 2000, v. 80, n. 1, p. 89-104, 2019.

WOO, Sook-Bin. Patologia oral. **Elsevier**, 3ª ed, cap 11, p275, Barcelona-Espanha, 2024.

II– NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

O processador de textos utilizado deve ser o Microsoft Word, margens de 3 cm em ambos os lados, em folha de tamanho A4, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço 1,5 em todas as seções. Não são aceitas notas de rodapé.

O original deve ser escrito na terceira pessoa do singular, com o verbo na voz ativa. Recomenda-se que a estrutura dos manuscritos obedeça às diretrizes de redação científica de acordo com delineamento da pesquisa. As diretrizes para redação de ensaios clínicos, revisões sistemáticas e estudos observacionais podem ser acessadas no site da iniciativa EQUATOR Network.

Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem obrigatoriamente ser acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

Os manuscritos aceitos para publicação poderão ser modificados para se adequar ao estilo editorial-gráfico da Revista, sem que, entretanto, nada de seu conteúdo técnico-científico seja alterado. Nesse caso, os autores serão previamente comunicados das mudanças ocorridas.

Principais Diretrizes sobre cada Seção:

1. Folha de Rosto deve conter:

a) Título do artigo com até 150 caracteres sem espaçamento, iniciando cada palavra com letra maiúscula e depois em minúscula, em português, inglês e espanhol e sem abreviações.

b) Título abreviado com até 50 caracteres sem espaçamento.

c) Autores.

Nome(s) por extenso do(s) autor(es).

Indicar afiliação institucional completa, localização geográfica, e-mail e Orcid iD para cada autor.

Todos os tipos de documentos, sem exceção, devem ter autoria com especificação completa dos níveis institucionais e local (cidade, estado e país). Cada nível institucional deve ser identificado em até três níveis hierárquicos ou programáticos em ordem de importância, por exemplo, universidade, faculdade e departamento.

Quando um autor é afiliado a mais de uma instância, cada afiliação deve ser identificada separadamente. Quando dois ou mais autores estão afiliados à mesma instância, a identificação da instância é feita uma única vez. No caso de autores sem nenhuma afiliação, a instituição é identificada como Pesquisador Autônomo.

d) Autor correspondente

Nome, endereço completo com CEP, telefone celular e e-mail do autor responsável pela correspondência sobre o manuscrito.

e) Critérios de autoria (contribuições dos autores)

A designação de autoria deve ser baseada nas deliberações do ICMJE, que considera autor aquele que: 1. contribui substancialmente na concepção e/ou no planejamento do estudo; 2. na obtenção, na análise e/ou interpretação dos dados; 3. assim como na redação e/ou revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

Os nomes dos pesquisadores responsáveis por estudos institucionais (de autoria coletiva) e estudos multicêntricos devem ser especificados e todos os que forem considerados autores devem cumprir os critérios listados acima.

f) Agradecimentos

Os demais colaboradores, que não se enquadram nos critérios de autoria anteriormente descritos, devem ter seus nomes referidos nesse item especificando o tipo de colaboração.

g) Declaração de conflito de interesses

É de responsabilidade dos autores a declaração sobre possíveis conflitos de interesse, incluindo interesses políticos ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais, insumos ou equipamentos utilizados no estudo.

Quando não houver, escrever “Nada a declarar”.

h) Fontes de financiamento

Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, público ou privado, para a realização da pesquisa (incluindo as agências de fomento) em cumprimento à Portaria Capes nº 206, de 4 de setembro de 2018, que dispõe sobre a obrigatoriedade de citação da Capes.

Também devem ser indicados o nome da empresa e a origem (cidade, estado e país) que forneceu o material, insumo ou equipamento, gratuito ou com desconto. Caso não exista financiamento, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento.

2. Resumo e Palavras-chave (descritores)

Os resumos dos artigos (exceto de opinião, cartas aos editores e resenhas) deverão ser redigidos em parágrafo único, em português, inglês e espanhol, e ser estruturados em introdução, objetivo, método, resultados e conclusão. Neles, não devem ser feitas citações de referências, bem como de quadros, tabelas ou figuras. As abreviaturas devem ser evitadas. Os resumos de Relato/Série de Casos possuem a seguinte estrutura: introdução, relato do caso, (resultados) e conclusão.

Todos os resumos deverão conter no mínimo 150 e no máximo 250 palavras e vir acompanhados das palavras-chave (de três a cinco) e de suas respectivas key words e palabras clave.

Os descritores são palavras fundamentais que auxiliam na indexação dos artigos em bases de dados nacionais e internacionais. Para determiná-los, deve-se consultar a lista de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) elaborada pela BIREME.

1. Introdução

O referencial teórico e as razões para executar a pesquisa devem estar detalhados de forma objetiva. Citar referências atuais e pertinentes. Deve conter o(s) objetivo(s) da pesquisa.

2. Método

Deve ser claramente descrito como e por que o estudo foi realizado. O detalhamento deve permitir que o leitor possa reproduzir a pesquisa realizada. O método inclui a descrição de delineamento, de seleção dos sujeitos da pesquisa, os critérios de inclusão e exclusão e a descrição da população-alvo, das técnicas de coleta, das variáveis coletadas, análise e interpretação dos dados.

Nos estudos quantitativos, os métodos estatísticos devem ser descritos com detalhes suficientes para que o leitor possa julgar sua adequação e conferir os resultados. Definir os termos estatísticos, as abreviações e símbolos. Se for usado algum pacote de programa estatístico, especifique a versão utilizada.

Nos estudos qualitativos, detalhar a teoria, as fontes de informação, os sujeitos da pesquisa (quando pertinente), e as técnicas empregadas para coleta, síntese e análise.

Quando forem relatados experimentos com seres humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos da instituição que aprovou a pesquisa, com a Declaração de Helsinque (última versão de 2013) e com as Resoluções números 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde. Não usar os nomes dos pacientes, iniciais ou números de registro, especialmente no material ilustrativo. No caso de experimentos envolvendo animais, indicar se foram seguidas as normas das instituições, dos Conselhos Nacionais de Pesquisa ou de alguma lei nacional sobre uso e cuidado com animais de laboratório.

Na submissão de manuscritos, é obrigatória a inclusão de declaração de que a pesquisa foi aprovada ou isenta de submissão pelo CEP.

Toda revisão sistemática deverá ter seu protocolo publicado ou registrado em uma base de registro de revisões sistemáticas, como por exemplo, o PROSPERO.

3. Resultados

Apresentar primeiro os resultados principais ou os mais importantes de acordo com o objetivo do trabalho. Descrever apenas os resultados encontrados, sem incluir interpretações ou comparações. Fornecer as informações referentes aos desfechos primários e secundários identificados na seção de métodos.

Apresentar os resultados, tabelas e ilustrações em sequência lógica, atentando para que o texto complemente e não repita o que está descrito em tabelas e ilustrações. Restringir tabelas e ilustrações às necessárias para explicar o argumento do artigo e para sustentá-lo. Usar gráficos como uma alternativa às tabelas com muitas entradas; não duplicar os dados em gráficos e tabelas.

Evitar uso de termos técnicos de estatística, tais como: “random” (que implica uma fonte de aleatorização), “normal”, “significante”, “correlação” e “amostra” de forma não técnica. Definir os termos estatísticos, abreviações e símbolos.

4. Discussão

Deve conter a interpretação dos autores, comparar os resultados com a literatura, relacionar as observações a outros estudos relevantes, apontar as limitações do estudo, enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo e as conclusões derivadas, incluindo sugestões para pesquisas futuras. Não repetir em detalhe dados ou outros materiais colocados nas seções de “introdução” ou “resultados”. A discussão pode ser redigida junto com os resultados, se for da preferência do autor somente nos estudos qualitativos.

5. Conclusão

Deve ser fundamentada nos resultados encontrados e vinculada aos objetivos do estudo. Afirmações não qualificadas e conclusões não apoiadas por completo pelos dados devem ser evitadas. Não devem ser feitas citações de referências, bem como quadros, tabelas ou figuras.

6. Referências

Devem ser numeradas no texto por números arábicos, em sobrescrito (ex.: A extensão da sobrevivência, entre outros¹), de forma consecutiva, de acordo com a ordem que são mencionadas pela primeira vez no texto e sem menção aos autores. A mesma regra aplica-se às tabelas e legendas.

Quando as citações forem sequenciais, devem ser separadas por um traço (3-7). Se forem intercaladas, devem ser separadas por vírgula (1,4,6,9). Sequenciais com apenas duas citações devem ser separadas por vírgula (3,4).

As referências devem ser verificadas nos documentos originais. Quando se tratar de citação de uma referência citada por outro autor deverá ser utilizado o termo “apud”. No entanto, essa possibilidade deve ser evitada ou empregada limitadamente.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Deve constar apenas referências relevantes e que realmente foram utilizadas no estudo.

Não há limites quanto ao número de referências. Porém, a quantidade de palavras será contabilizada no total permitido para cada tipo de manuscrito.

As referências devem seguir os padrões resumidos no documento original em inglês do ICMJE intitulado Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References ou os padrões apresentados na íntegra na publicação Citing Medicine 2nd Edition (conhecidos como ‘Estilo de Vancouver’).

Para a padronização dos títulos dos periódicos nas referências, é utilizado como guia o LocatorPlus, fonte de consulta da National Library of Medicine, que disponibiliza, na opção Journal Title, o título e/ou a abreviatura utilizada.

Incluir o nome de até três autores na ordem em que aparecem na publicação, iniciando-se pelo sobrenome seguido de todas as iniciais dos prenomes separando cada autor por vírgula. No caso de a publicação apresentar mais de três autores, os três primeiros são citados, separando por vírgula seguida da expressão *et al.*

Quando o sobrenome do autor incluir grau de parentesco – Filho, Sobrinho, Júnior, Neto – deve ser subsequente ao último sobrenome: João dos Santos de Almeida Filho = Almeida Filho JS, José Rodrigues Junior = Rodrigues Junior J.

Títulos devem ser escritos com a primeira letra em caixa alta e as subsequentes em caixa baixa. As exceções são nomes próprios, nomes de ciências ou disciplinas, instituições de ensino, países, cidades ou outros, e nomes de entidades públicas ou particulares.

As abreviaturas devem estar de acordo com a lista de periódicos no PubMed.

Todas as referências deverão vir com seus respectivos Digital Object Identifier (DOI).

7. Tabelas

As tabelas são utilizadas para exibir informações de maneira concisa e de fácil visualização. A inclusão de dados ou informações em tabelas, em vez de descritas no texto tem como finalidade reduzir o tamanho do texto.

Numerar as tabelas sequencialmente de acordo com a ordem de sua citação no texto e dar um título curto a cada uma. As tabelas deverão ser apontadas no corpo do texto, porém enviadas em laudas separadas.

Definir para cada coluna um cabeçalho abreviado ou curto. Colocar as explicações no rodapé das tabelas e não no cabeçalho. Explicar, em notas de rodapé, todas as abreviações não padronizadas usadas em cada tabela. Utilizar símbolos para explicar as informações (letras do alfabeto ou símbolos como *, §, †, ‡).

Cada dado na tabela deve ser inserido em uma célula separadamente, e dividida em linhas e colunas. Ou seja, não incluir mais de uma informação dentro da mesma célula. Caso um conteúdo de uma célula faça referência a mais de um conteúdo em outra coluna, deve-se usar, para essa célula, o recurso “mesclar células”. Não enviar as tabelas como imagem para que possam ser editadas.

Identificar medidas estatísticas de variações, tais como: desvio-padrão e erro-padrão da média. Verificar se cada tabela seja citada no texto por sua numeração e não como tabela a seguir, tabela abaixo.

O uso de tabelas grandes, ou em excesso em desproporção com o texto, pode dificultar a formatação de apresentação das páginas.

8. Ilustrações

As ilustrações (figuras, quadros, tabelas e gráficos etc. em p&b ou coloridas) devem estar inseridas no texto com os títulos completos, indicação de fontes, legendas e notas adicionais quando necessárias. Todas as ilustrações mencionadas deverão ser enviadas em formato editável. Não colocar os títulos e explicações nas ilustrações e sim nas legendas.

Se forem usadas fotografias de pessoas, os sujeitos não devem ser identificáveis ou suas fotografias devem estar acompanhadas por consentimento escrito para publicação.

As ilustrações devem ser numeradas de acordo com a ordem em que foram citadas no

texto. Se uma ilustração já foi publicada, citar a fonte original e enviar a autorização escrita do detentor dos direitos autorais para reproduzir o material. A autorização é requerida, seja do autor ou da companhia editora, com exceção de documentos de domínio público.

Fotografias devem ser fornecidas da seguinte forma: arquivo digital em formato. TIFF, JPG, EPS, com resolução mínima de: 300 dpi para fotografias comuns; e 600 dpi para fotografias que contenham linhas finas, setas, legendas etc.

Gráficos, desenhos, tabelas e quadros devem ser enviados em arquivos: Word, Excel, PowerPoint em formato editável (arquivo aberto). Para desenhos e gráficos, a resolução mínima é de em 1.200 dpi.

9. Nomenclatura

Devem ser observadas rigidamente as regras de nomenclatura biomédica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

Recomenda-se que, no uso dos principais vocábulos relacionados ao câncer, sejam adotados os conceitos dos Glossários Temáticos Controle de Câncer e Fatores de Proteção e de Risco de Câncer.

Recomenda-se também evitar o uso de siglas ou acrônimos não usuais. Siglas ou acrônimos só devem ser empregados quando forem consagrados na literatura, prezando-se pela clareza do manuscrito.

Exemplos de siglas consagradas: ONU, HIV, aids. Confira o Siglário Eletrônico do Ministério da Saúde.

Os originais em língua portuguesa deverão estar em conformidade com o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

10. Requisitos Técnicos para a Apresentação de Manuscritos

Antes de submeter o manuscrito, confira se as “Instruções para Autores” e se os itens abaixo foram atendidos:

Submeter o arquivo integral do manuscrito em Microsoft Word. Utilizar espaçamento 1,5 em todas as partes do documento.

Revisar a sequência: folha de rosto; resumos e palavras-chave (de três a cinco e respectivas key words e palabras clave) e a estrutura (seções) do artigo.

Tabelas, quadros e figuras (com legendas) devem ser inseridos e citados no decorrer do texto, não no final do documento na forma de anexos.

Referências devem ser numeradas, em sobrescrito, na ordem de aparecimento no texto, corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.

Formulário de Submissão e Declaração de Direitos Autorais preenchido e assinado somente pelo autor responsável pela submissão.

Adicionar permissão para reproduzir material previamente publicado ou para usar ilustrações que possam identificar indivíduos.

Preencher o checklist.

III - ARTIGO ORIGINAL

Alterações Histológicas Na Língua De Camundongos Após Indução Da Carcinogênese Com 4-Nitroquinolina-1-Óxido

Histological Changes In The Tongue Of Mice After Carcinogenesis Induction With 4-
Nitroquinoline-1-Oxide

Alteraciones Histológicas En La Lengua De Ratones Tras La Inducción De
Carcinogénesis Con 4-Nitroquinolina-1-Óxido

Carcinogênese Induzida Em Línguas De Camundongos

Renan Silva Santos ¹; Rosilene Calazans Soares¹; Débora dos Santos Tavares¹

1. Universidade Federal de Sergipe (UFS). Aracaju/SE, Brasil. E-mails:
renansantos@academico.ufs.br; tavaresdebora@academico.ufs.br;
rosilene@academico.ufs.br; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9812-4789>; Orcid
iD: <https://orcid.org/0000-0002-8392-9653>; <https://orcid.org/0000-0001-5452-0771>.
Endereço para correspondência: Renan Silva Santos. Rua Beco do Engenho Novo, 180,
Porto Dantas– Aracaju/SE, Brasil. CEP:49067023, Tel.: (79)988768898. E-mail:
renansantos14121999@gmail.com.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma de células escamosas (CCE) representa mais de 90% dos cânceres de orofaringe, sendo o tabagismo o principal fator de risco. O 4NQO induz nos camundongos lesões semelhantes às do tabagismo nos humanos, devido à similaridade do mecanismo de ação dos carcinógenos e do epitélio da língua. **OBJETIVO:** Esse estudo visou analisar histologicamente as lesões provocadas pelo 4NQO na língua de camundongos. **METODOLOGIA:** Foram utilizados 24 camundongos C57BL/6: 12 animais receberam o 4NQO (100 µg/ml) na água de beber, sendo que 6 beberam por 14 semanas (G1A) e foram eutanasiados e os outros 6 beberam por 14 semanas, observados por 9 semanas com água autoclavada (G1B) e eutanasiados. Os outros 12 animais foram divididos em 2 grupos controle de 6 camundongos, observados por 14 semanas (G2A) e 23 semanas (G2B) com água de beber autoclavada. As línguas foram imersas em formaldeído a 10%, incluídas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina. **RESULTADOS:** No G1A 2 animais desenvolveram displasia leve e 4 CCE. No G1B todos os animais desenvolveram CCE. No G2A e no G2B (grupos controle), não ocorreram lesões. **CONCLUSÃO:** O 4NQO (100 µg/ml) provoca displasia epitelial e CCE em 14 semanas (G1A) e CCE em 100% dos animais com 23 semanas (G1B), sendo o período de observação necessário para a progressão das alterações epiteliais em câncer. Conclui-se que para o desenvolvimento do CCE, tanto a concentração do carcinógeno quanto o tempo de indução e de observação são de suma importância.

Palavras chave: Carcinoma; Camundongo; Língua; Displasia.

SUMMARY

INTRODUCTION: Squamous cell carcinoma (SCC) accounts for more than 90% of oropharyngeal cancers, with smoking being the main risk factor. 4NQO induces lesions in mice similar to those caused by smoking in humans, due to the similarity in the mechanism of action of the carcinogens and the tongue epithelium. **OBJECTIVE:** This study aimed to histologically analyze the lesions caused by 4NQO in the tongues of mice. **METHODOLOGY:** Twenty-four C57BL/6 mice were used: 12 animals received 4NQO (100 µg/ml) in drinking water, with 6 drinking for 14 weeks (G1A) and then euthanized, and the other 6 drinking for 14 weeks, observed for 9 weeks with autoclaved water (G1B), and then euthanized. The other 12 animals were divided into 2 control groups of 6 mice, observed for 14 weeks (G2A) and 23 weeks (G2B) with autoclaved drinking water. The tongues were immersed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin. **RESULTS:** In G1A, 2 animals developed mild dysplasia and 4 developed SCC. In G1B, all animals developed SCC. In G2A and G2B (control groups), no lesions occurred. **CONCLUSION:** It was concluded that 4NQO (100 µg/ml) induces epithelial dysplasia and SCC within 14 weeks (G1A) and SCC in 100% of animals within 23 weeks (G1B), with the observation period being necessary for the progression of epithelial alterations to cancer. It is concluded that for SCC development, both the carcinogen concentration and the induction and observation time are of paramount importance.

Keywords: Carcinoma; Mice; Tongue; Dysplasia.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El carcinoma de células escamosas (CCE) representa más del 90% de los cánceres de orofaringe, siendo el tabaquismo el principal factor de riesgo. El 4NQO induce en los ratones lesiones similares a las del tabaquismo en humanos, debido a la similitud del mecanismo de acción de los carcinógenos y de los epitelios de la lengua. **OBJETIVO:** Este estudio tuvo como objetivo analizar histológicamente las lesiones provocadas por el 4NQO en la lengua de ratones. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron 24 ratones C57BL/6: 12 animales recibieron 4NQO (100 µg/ml) en el agua de bebida, de los cuales 6 bebieron durante 14 semanas (G1A) y fueron eutanasiados, y los otros 6 bebieron durante 14 semanas, fueron observados durante 9 semanas con agua esterilizada en autoclave (G1B) y eutanasiados. Los otros 12 animales se dividieron en 2 grupos control de 6 ratones, observados durante 14 semanas (G2A) y 23 semanas (G2B) con agua de bebida esterilizada en autoclave. Las lenguas se sumergieron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. **RESULTADOS:** En el G1A, 2 animales desarrollaron displasia leve y 4 CCE. En el G1B, todos los animales desarrollaron CCE. En el G2A y el G2B (grupos control), no se observaron lesiones. **CONCLUSIÓN:** Se concluyó que el 4NQO (100 µg/ml) provoca displasia epitelial y CCE en 14 semanas (G1A) y CCE en el 100% de los animales en 23 semanas (G1B), siendo el período de observación necesario para la progresión de las alteraciones epiteliales a cáncer. Se concluye que, para el desarrollo del CCE, tanto la concentración del carcinógeno como el tiempo de inducción y de observación son de suma importancia.

Palabras clave: Carcinoma; Ratones; Lengua; Displasia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	36
2. METODOLOGIA	37
2.1 Comitê de ética e pesquisa	37
2.2 Carcinógeno, Indução e Eutanásia	37
2.3 Preparo histológico das peças.....	38
2.4 Análise histológica.....	38
2.5 Captura de imagens das lâminas	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Epitélio normal e grupos controle	40
3.2 Experimento durante 14 semanas.....	41
3.3 Experimento durante 23 semanas.....	43
3.4 Tempo de indução, tempo de observação e concentração de 4NQO	44
4. CONCLUSÃO.....	48
5. CONTRIBUIÇÕES	48
6. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES	48
7. FONTES DE FINANCIAMENTO.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa cerca de 90% a 95% das neoplasias malignas da orofaringe, desse modo é essencial que se conheça a fundo sua fisiopatologia bem como suas lesões precursoras. O estudo dos fatores de risco associados ao CCE mostrou que o tabagismo e o etilismo têm forte relação com o surgimento dessas lesões, dessa forma, estudos *in vitro* e *in vivo* de lesões precursoras e do próprio CCE são fundamentais para auxiliar os profissionais na detecção e tratamento precoce dessa patologia^{1,2}.

Em trabalhos com animais (*in vivo*), o 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) é um dos carcinógenos mais utilizados, por ser capaz de desenvolver lesões que se assemelham às encontradas em humanos. Além disso, é possível observar as diferentes fases da carcinogênese desde lesões iniciais (consideradas potencialmente malignas, como a displasia epitelial), o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo³. O uso dessa substância foi descrito, em 1973, por Wallenius e Lekholm e desde então vem sendo utilizado em diversos estudos com o intuito de induzir lesões tanto potencialmente malignas quanto malignas em ratos e camundongos, das mais variadas maneiras, desde a aplicação tópica até o uso sistêmico através da água para beber disponibilizada aos animais.

A escassez de tratamentos adequados e modernos é uma realidade no que diz respeito tanto ao câncer de boca, quanto às lesões potencialmente malignas, devido ao mau prognóstico relacionado ao diagnóstico tardio. Assim, quando as lesões precursoras são detectadas precocemente e tratadas adequadamente eleva-se em 80% as chances de cura, uma vez que ainda não houve metástase³⁻⁵. Sendo assim, este trabalho buscou avaliar o efeito do 4NQO no desenvolvimento de alterações histológicas (displásicas ou potencialmente malignas) na língua de camundongos da linhagem C57BL/6 através da análise histológica em coloração hematoxilina e eosina.

2. METODOLOGIA

2.1 Comitê de ética e pesquisa

Esta pesquisa faz parte do projeto intitulado “Efeito do carvacrol livre e nanoencapsulado na carcinogênese oral induzida pelo 4NQO em camundongos BALB-C e C57BL/6” aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) com o número 22/2019.

2.2 Carcinógeno, Indução e Eutanásia

O 4NQO (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água destilada na concentração de 4 g/ml (solução estoque), e mantido sob refrigeração a uma temperatura de 4°C. Para o experimento animal, a solução estoque foi diluída em água autoclavada na concentração final (uso) de 100 µg/ml^{6,7}. Esta solução foi disponibilizada para os animais, sendo a única fonte hídrica, deixando o seu consumo livre, com renovação uma vez por semana.

Os bebedouros utilizados foram envoltos em papel alumínio, com o objetivo de prevenir a degradação do 4NQO, que é fotossensível, sendo utilizados somente para esse fim^{3-5,8,9}. Os animais foram monitorados diariamente quanto a presença de anormalidades comportamentais gerais, sinais de toxicidade ou outras doenças, bem como sinais de dor ou desconforto. O peso dos animais também foi verificado semanalmente com o intuito de avaliar o estado clínico geral. A eutanásia foi realizada por dose supraliminar de anestésico (isoflurano 3% por via inalatória), sendo a morte foi confirmada por ausência de sinais vitais, e então dissecados para remoção dos órgãos. A pesquisa utilizou 24 camundongos fêmeas C57BL/6, com 8 semanas de idade e o experimento teve a duração total de 23 semanas. Doze animais compuseram o grupo de indução química pelo 4NQO, dos quais 6 ingeriram 4NQO por 14 semanas e foram eutanasiados sem tempo de observação (grupo 1A), enquanto os outros 6 ingeriram o 4NQO por iguais 14 semanas, porém foram mantidos, após esse período, somente com água autoclavada por 9 semanas e ao término da observação foi realizada a eutanásia (grupo 1B). O grupo controle composto por 12 animais foi mantido durante toda a pesquisa apenas com água autoclavada, sendo 6 eutanasiados na semana 14 (grupo 2A)

e os outros 6 na semana 23 (grupo 2B), para efeito de comparação com o grupo ao qual foi realizada a indução.

2.3 Preparo histológico das peças

Após a eutanásia e a dissecação dos animais, as línguas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído a 10%, posteriormente realizou-se a inclusão das 24 peças com o protocolo: etanol I a 80% (40 minutos); etanol II a 90% (40 minutos); etanol III a 100% (40 minutos); xilol I 98,5% (60 minutos); xilol II 98,5% (60 minutos); parafina derretida I (60 minutos); parafina derretida II (60 minutos), nessa ordem. O etanol em concentração crescente foi realizado para alcançar uma desidratação progressiva da peça a ser incluída na parafina. O xilol foi utilizado em dois recipientes, uma vez que o primeiro recipiente receberia uma maior quantidade de álcool, vinda do etanol III, se tornando mais impuro que o xilol II.

Após a inclusão dos materiais, estes foram colocados em parafina líquida e deixados para esfriar formando blocos de parafina sólida, após isso as peças foram cortadas em um micrótomo manual com 4 micrômetros de espessura. Com as peças cortadas e colocadas em lâminas histológicas fez-se o processo de coloração em Hematoxilina e Eosina com o seguinte protocolo: xilol I 98,5% (3 minutos); xilol II 98,5% (3 minutos); etanol I 80% (2 minutos); etanol II 90% (2 minutos); etanol III 100% (2 minutos); água destilada (5 segundos); hematoxilina (4 minutos); água destilada (5 segundos); eosina 5% (5 segundos); água acética 1% (2 minutos); etanol I a 80% (2 minutos); etanol II 90% (2 minutos); etanol III 100% (2 minutos); xilol I 98,5% (3 minutos); xilol II 98,5% (3 minutos).

2.4 Análise histológica

A análise histológica das línguas foi feita em um microscópio ótico binocular nas lentes de aumento em: 4 vezes, 10 vezes e 40 vezes, respectivamente. Os critérios usados para classificar os achados foram baseados nas normas da OMS¹⁰. Desse modo, as displasias foram classificadas em leve, moderada e severa; os CCE foram diagnosticados quando detectada destruição da membrana basal epitelial com invasão do tecido conjuntivo subjacente por células neoplásicas. Hiperplasia e hiperqueratose

foram definidas como epitélio espessado com queratinização superficial proeminente com ou sem cristas alongadas.

A displasia epitelial oral foi diagnosticada quando o epitélio exibiu atipias celulares (anomalias nucleares, aumento do número de mitoses) e alterações no arranjo celular em si (perda de polaridade nas células epiteliais, disqueratose, cristas epiteliais digitiformes) nas camadas do terço inferior (displasia leve), potencialmente estendida para as camadas do terço médio (displasia moderada) e terço superior (displasia severa/carcinoma *in situ*)^{11,12}. O carcinoma de células escamosas (CCE) foi definido pela presença de células epiteliais atípicas, com dano a camada basal e invadindo o estroma/tecidos conjuntivo¹³.

2.5 Captura de imagens das lâminas

A captura das imagens foi realizada através de uma câmera acoplada a um microscópio óptico automático *Olympus IX 81*, ambos acoplados a um computador. As lâminas foram analisadas e fotografadas no Laboratório de Neurociência Molecular de Sergipe que está localizado no Departamento de Morfologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Sergipe. Todas as lâminas foram fotografadas em aumentos de 10X, 20X e 40X. Ao final da captura das imagens, as melhores foram selecionadas, nos aumentos que mais evidenciassem as alterações epiteliais em questão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução em camundongos C57BL/6 com o 4NQO é utilizada em diversos estudos devido à semelhança entre o epitélio de revestimento oral humano e o epitélio de revestimento oral desses animais^{14,15}. O 4NQO tem o potencial de gerar lesões malignas através do aumento do estresse oxidativo celular, efeito esse que é semelhante aos danos celulares ocasionados por carcinógenos presentes no tabaco à mucosa oral de humanos^{15,16}.

Em relação ao tempo de indução com o 4NQO, levou-se em consideração estudos semelhantes anteriores que mostravam que o desenvolvimento de displasias de

moderada a grave foram vistas na língua dos animais por volta da 15ª semana de indução; displasia severa e carcinoma de células escamosas foram encontrados por volta da 20ª semana de indução; 100% dos animais exibiam carcinoma por volta da 25ª semana de indução; mortes começaram ser observadas por volta da 32ª semana de indução^{6-9,16-18}. O camundongo número 5 do grupo 1B foi eutanasiado antes do final do experimento, pois estava machucado (provável briga entre os animais), ficando incapaz de comer e de beber água, logo, seus órgãos não foram incluídos na análise das peças removidas.

3.1 Epitélio normal e grupos controle

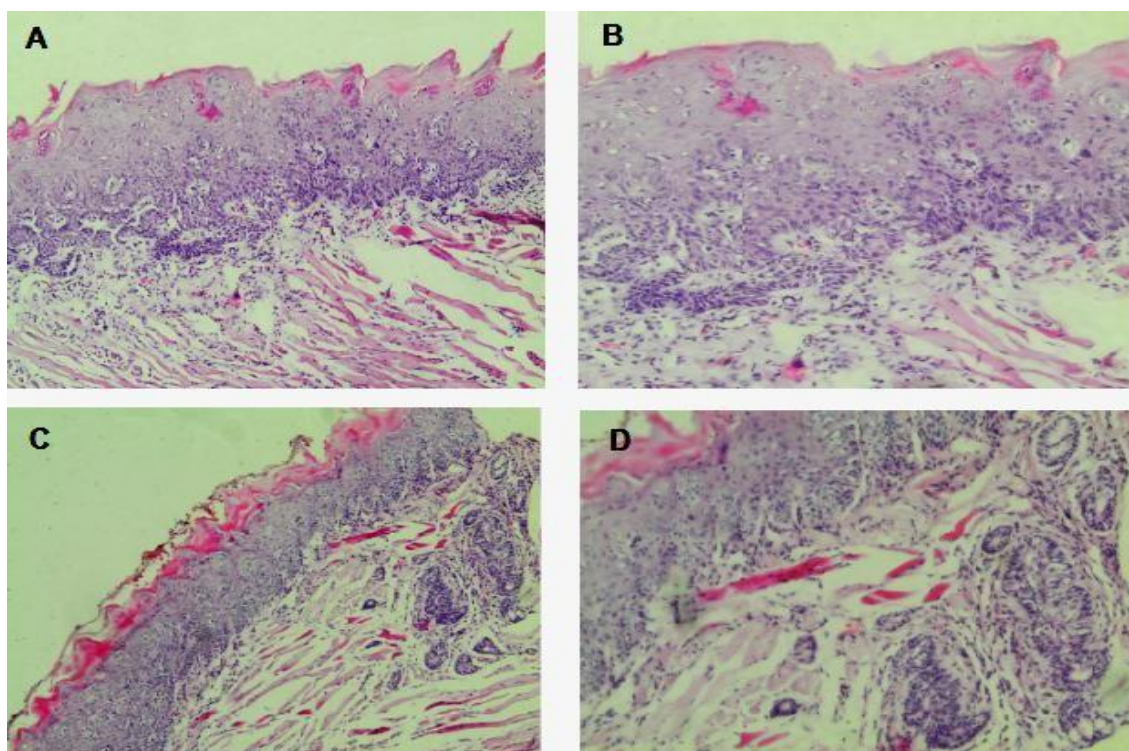
O revestimento da língua dos camundongos é do tipo epitélio escamoso (pavimentoso) estratificado queratinizado, composto por camadas como a córnea, a espinhosa e a basal¹⁹. A camada córnea é composta por células cornificadas que têm queratina no seu citoplasma, logo há constante renovação nessa área²⁰. A camada espinhosa é composta por células de formato plano, unidas por desmossomos, estando entre a camada córnea e a camada basal²¹. Diferentemente das outras camadas, a basal é composta por células de formato cilíndrico, essa região é importante para a renovação de todo o epitélio, uma vez que nela há grande atividade mitótica²⁰.

Assim como em Hawkins et al.²²; Li et al.⁵; Miki et al.⁹; Vincent-Chong et al.¹³; Stashenko et al.¹⁸; Yin et al.⁴ e Lança et al.¹⁶, nos grupos controle deste estudo (grupo 2A e grupo 2B) não se observou quaisquer lesões de característica potencialmente maligna ou maligna, logo, as lesões não se desenvolveram de forma espontânea nos animais não expostos ao 4NQO. Independentemente do tempo em que foi realizada a observação desses grupos (grupo 2A: 14 semanas; grupo 2B: 23 semanas), todos os epitélios das línguas dos camundongos analisados, neste estudo, mantiveram suas características. As células mantiveram seus arranjos celulares típicos, membrana basal íntegra e bem delimitada, formato celular regular e uniforme, núcleo preservado, estratificação normal e sem presença de figuras de mitose fora da camada basal.

3.2 Experimento durante 14 semanas

Estudos mostraram que por volta da 14ª semana de indução com 4NQO já havia lesões potencialmente maligna e CCE nos animais^{6-9,17,18}. Com intuito de visualizar não só CCE, mas também lesões precursoras de câncer, optou-se por realizar o experimento nesse grupo por 14 semanas, sem período de observação. No grupo em que houve a indução com o carcinógeno foram desenvolvidos CCE (Figura 1) e displasias leves (Figura 2); não houve alterações histológicas no grupo controle, como mostra a Tabela 1. Desse modo, ratifica-se o potencial do 4NQO de produzir tanto lesões precursoras, quanto CCE, que apresentam similaridade de até 94% com as lesões desenvolvidas por carcinógenos do tabaco na língua humana^{3,16}.

Figura 1. Foto da microscopia ótica. A: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 5 do grupo 1A no aumento de 10X. B: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 5 do grupo 1A no aumento de 20X. C: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 6 do grupo 1A no aumento de 10X. D: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 6 do grupo 1A no aumento de 2X.

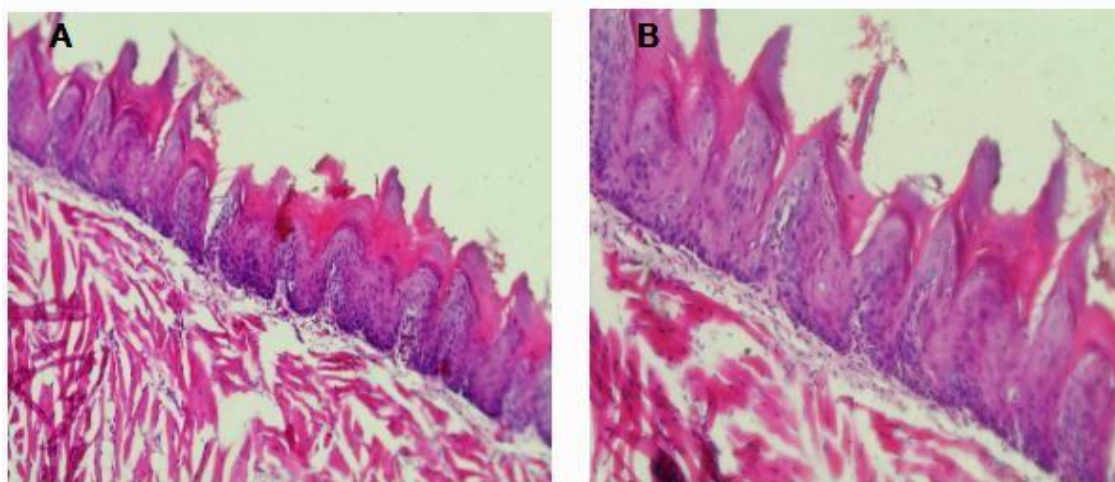


Fonte: Autoria própria, 2023.

Segundo os critérios da OMS¹⁰, vistos também em Vincent-Chong et al.¹³, o carcinoma de células escamosas pode ser diagnosticado pela presença de células

atípicas epiteliais com dano à membrana basal, desse modo as células neoplásicas epiteliais estariam invadindo o tecido conjuntivo subjacente. As imagens da Figura 1 mostram exatamente a definição proposta, uma vez que é possível ver um tecido com alta atividade mitótica, hiperplásico, aliado a células com atipias nucleares associadas a uma membrana basal não delimitada, por vezes rompida, e aglomerados de células neoplásicas invadindo o tecido conjuntivo. Os tecidos epiteliais nas imagens da Figura 1, não exibem o padrão de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado característico da língua dos camundongos, não sendo visualizadas de forma clara as três principais camadas desse tecido. Nos grupos controle, as imagens mostram como a membrana basal é bem delimitada, assim como as células têm um arranjo uniforme entre si, núcleos e formato do citoplasma celular são típicos da camada que a célula ocupa seja a camada córnea, seja a camada espinhosa, seja a camada basal¹⁹.

Figura 2. Foto da microscopia ótica. A: Displasia leve no epitélio da língua do camundongo 2 do grupo 1A no aumento de 10X. B: Displasia leve no epitélio da língua do camundongo 2 do grupo 1A no aumento de 20X.



Fonte: Autoria própria, 2023.

O diagnóstico da displasia leve segundo a OMS¹⁰, como visto na imagem A e B da Figura 2, corrobora com a definição de Warnakulasuriya et al.¹¹ e de Warnakulasuriya et al.¹², uma vez que vemos um desarranjo estrutural no terço inferior do epitélio da língua do camundongo. Nessa região, há uma elevada celularidade, o que revela um aumento da atividade mitótica, não obstante, vemos células com núcleos totalmente atípicos, sem uma forma definida, alguns arredondados, outros em formato

de bastão, dentre outras formas. A hematoxilina corou com mais vigor nesta área, por ser um corante com afinidade a núcleos celulares, comprovando a alta celularidade e consequentemente alta atividade mitótica nesta região, mesmo quando a lâmina é examinada em menores aumentos (em 10X, por exemplo). Também é visto que a membrana basal do tecido está íntegra e não há invasões de células neoplásicas no tecido conjuntivo, logo o diagnóstico de CCE não pode ser aplicado. Com tais atipias nucleares associadas a elevada atividade mitótica da região encontrando-se somente no terço inferior do tecido, considerou-se, desse modo, uma displasia leve, segundo os critérios adotados.

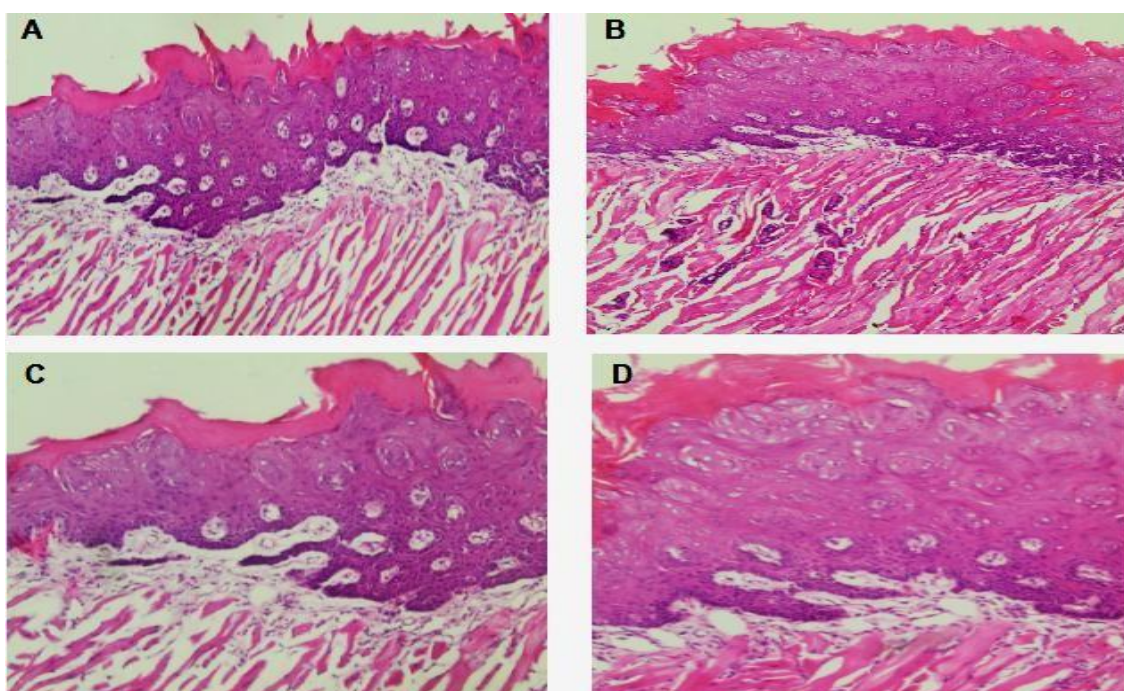
3.3 Experimento durante 23 semanas

Com a indução com 4NQO em um grupo de animais por 14 semanas e após isso observação por 9 semanas (grupo 1B), sem a presença do carcinógeno, foi possível obter lesões malignas (Figura 3) em todos os animais. Desse modo, mesmo não havendo a agressão direta e formação de novas espécies reativas de oxigênio pelo 4NQO¹⁵, pois na observação era disponibilizada somente água autoclavada aos animais, retirar essa substância não proporcionou a remissão das possíveis lesões potencialmente malignas já instaladas nos animais, concluindo a fase de progressão da carcinogênese química. O tempo de observação foi crucial para o desenvolvimento do CCE em todos os animais, logo se ratifica a teoria de Hawkins et al.²² de que não só o tempo de indução, mas também o tempo de observação possui grande importância no desenvolvimento de lesões com 4NQO na língua de camundongos. A Tabela 2 mostra as lesões encontradas na análise do grupo experimento (grupo 1B) e do grupo controle (grupo 2B).

As imagens da Figura 3 mostram um epitélio espessado, com alta atividade mitótica, suas células apresentam núcleos com atipias, não sendo característico do epitélio da língua dos camundongos. Nas imagens A e B, são vistos aglomerados de células neoplásicas (provenientes do epitélio onde há o CCE) no tecido conjuntivo subjacente, em B especificamente, pode-se notar que essas células chegam a invadir o tecido muscular da língua do animal. Nas imagens C e D, podemos ver a presença de pérolas de ceratina no terço médio, hiperplasia com células atípicas em toda a extensão

epitelial e projeções epiteliais digitiformes em direção ao tecido conjuntivo; nos grupos controle, essa membrana era muito bem delimitada, sem danos e sem projeções em direção ao tecido conjuntivo da língua do camundongo. Seguindo os critérios usados por Vincent-Chong et al.¹³ e da OMS¹⁰ pode-se classificar ambas as lesões como carcinomas de células escamosas.

Figura 3. Foto da microscopia ótica. A: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 1 do grupo 1B no aumento de 10X. B: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 3 do grupo 1B no aumento de 10X. C: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 1 do grupo 1B no aumento de 20X. D: carcinoma de células escamosas na língua do camundongo 3 do grupo 1B no aumento de 20X.



Fonte: Autoria própria, 2023.

3.4 Tempo de indução, tempo de observação e concentração de 4NQO

O processo de alterações genéticas através da carcinogênese química é composto basicamente por três etapas: iniciação, promoção e progressão²³. Na iniciação, ocorre uma resposta celular a exposição ao carcinógeno, nesse momento a célula sofre mutações em seu DNA, logo, tais danos são irreversíveis. Ainda nessa etapa, a célula adquire potencial de desencadear um tumor, entretanto somente a etapa de iniciação isolada não é capaz de gerar um tumor invasivo. Na etapa seguinte, a promoção, agentes promotores, embora não tenham ação direta sobre o DNA, promovem a proliferação das células já iniciadas e por não terem essa ação direta no

DNA as mutações podem ser reversíveis ao se retirar o agente promotor. Alguns carcinógenos podem agir tanto na iniciação quanto na fase de promoção, sendo assim considerados carcinógenos completos²⁴. A fase de progressão depende da persistência da fase de promoção, nessa fase, as células adquirem novas mutações, o que desregula sua proliferação, podendo estas adquirirem autonomia quanto ao seu processo mitótico, dessa forma, como final dessa etapa, teremos a presença de um tumor invasivo (câncer)²³⁻²⁵. Ademais, é válido salientar que o 4NQO age como um carcinógeno completo, provocando a iniciação, a promoção e consequentemente a progressão neoplásica²⁶.

Assim, o tempo de indução bem como o tempo de observação torna-se essencial no processo de indução da carcinogênese química nos animais, uma vez que o processo de progressão, ou seja, o desenvolvimento de CCE, não acontece de forma imediata ao iniciar a indução, bem como tal fase pode não estar finalizada no fim do experimento em que não houve a observação. A interrupção da fase de progressão foi vista neste estudo nos animais do grupo 1A, onde ao final do experimento apenas 2 animais (33,4%) apresentavam lesões potencialmente malignas. Ao se realizar a observação, respeitando-se assim o tempo para a conclusão da etapa de progressão (grupo 1B), 100% dos os animais apresentaram carcinoma de células escamosas no epitélio da língua de acordo com os critérios diagnósticos adotados.

A importância do período de observação após a indução com carcinógeno já foi descrita por Hawkins et al.²², que realizou o experimento em camundongos CAB, aplicando topicamente o 4NQO na concentração de 5000 µg/ml (diluído em propilenoglicol) no palato dos camundongos por até 16 semanas (período de indução) e observando por um período de 24 a 49 semanas, com eutanásia de 5 animais a cada 4 semanas após o fim da indução. Na 8ª semana de observação (24ª semanas do início do experimento) foram vistas apenas displasias, enquanto que na 33ª semana de observação (49ª semana de experimento) todos os animais eutanasiados exibiam CCE. Concluiu-se que a gravidade das lesões corresponde ao somatório do tempo de indução e observação. Tal fato foi ratificado nesse estudo, uma vez que foi realizada a indução por 14 semanas e eutanásia sem o período de observação (14 semanas de experimento) e também a indução por igual período e observação por 9 semanas (23 semanas de

experimento), sendo que o experimento sem observação teve a incidência de 66,6% de CCE, quando adicionado o período de observação esse percentual chegou a 100% de CCE. Diferente de Hawkins et al.²², este estudo realizou a diluição do 4NQO em água autoclavada em uma concentração 50 vezes menor que a utilizada Hawkins et al.²² e obteve resultados semelhantes, na 23ª semana do início deste experimento 100% dos animais desenvolveram CCEO. Ainda em relação a Hawkins et al.²², este estudo embora tenha realizado duas semanas a menos no período de indução, obteve 100% dos animais com CCEO em 23 semanas de tempo total de experimento, grupo 1B, enquanto em Hawkins et al.²², isso somente foi obtido após 49 semanas de tempo total do experimento.

Em estudo semelhante ao de Hawkins et al.²², porém diferindo no método de oferta do carcinógeno, na espécie dos camundongos, na concentração de 4NQO e no meio em que foi diluído o 4NQO, Li et al.⁴ realizou o experimento com 32 camundongos Balb/c, dividiu em 8 grupos de 4 Balb/c cada, ofertando o 4NQO diluído na água de beber aos animais na concentração de 200 µg/ml. Em Li et al.⁴, o tempo de indução foi de 20 semanas, realizado a observação do primeiro grupo por 4 semanas e a eutanásia de mais um grupo a cada 2 semanas até a 40ª semana. Entre a 25ª e 32ª semana foram observados um total de 68,8% de animais com CCE, já entre a 33ª e 40ª semana 100% dos animais apresentaram CCE. Embora este estudo tenha utilizado uma espécie diferente e uma concentração equivalente à metade da utilizada por Li et al.⁴ (como descrito anteriormente, neste estudo utilizou-se 100 µg/ml), nos animais eutanasiados após o período de observação na 23ª semana de tempo total do estudo, grupo 1B, já se obteve 100% de CCE nas línguas analisadas. Desse modo, mostrou-se que foi possível desenvolver CCE em todos os animais do experimento em um período de tempo mais curto e com uma menor concentração de carcinógeno.

Além disso, foi observado que concentrações de carcinógeno menores que a utilizada neste estudo, mesmo com períodos de indução e de observação mais longos como feito por Stashenko et al.¹⁷ não foi verificado CCE em todos os animais expostos ao 4NQO. Em seu estudo, Stashenko et al.¹⁷ utilizou a concentração de 50 µg/ml do 4NQO, em camundongos C57BL/6, por um período de 16 semanas de indução, seguidos de 10 semanas de observação. Ao final do seu estudo, obteve em seus animais

epitélios normais, hiperplasias, displasia moderada e também CCE. A mesma concentração, 50 µg/ml, foi utilizada por Lança et al.¹⁵, também em camundongos C57BL/6, entretanto, não foi realizado período de observação. Em Lança et al.¹⁵, os animais foram eutanasiados com 12, 16 e 20 semanas e foram observadas displasia leve, displasia moderada e somente na 20ª semana foi visto CCE nas línguas analisadas. Desse modo, podemos verificar que assim como o tempo de indução e o tempo de observação, a concentração do carcinógeno é de extrema importância para o surgimento de CCE em um menor período de realização do experimento.

Em contrapartida, utilizar concentrações acima da utilizada neste estudo não mostrou uma maior eficácia no que diz respeito ao desenvolvimento de CCE. Miki et al.⁸, utilizaram uma concentração de 4NQO de 200 µg/ml, o dobro da utilizada na presente pesquisa, também em camundongos C57BL/6, por um período máximo de indução de 20 semanas e tempo máximo de observação de 10 semanas, sendo os animais eutanasiados na semana 15, 20, 25, 30 do início do experimento. Como resultado, Miki et al.⁸, obteve entre a 10ª e a 15ª semana de indução displasias (moderada e severa); entre a 15ª e a 20ª semana displasia severa e CCE; entre a 20ª e 30ª semana 100% dos animais com CCE. Neste estudo, foi possível desenvolver na língua dos camundongos na 14ª semana: displasia leve e CCE, grupo 1A; na 23ª semana, grupo 1B: 100% dos animais desenvolveram CCE, embora usando metade da concentração de carcinógeno, obteve-se resultados semelhantes aos encontrados em Miki et al.⁸.

Em estudos onde foram utilizadas 100 µg/ml de 4NQO, como foi feito em Yin et al.³ e em Vincent-Chong et al.¹³, embora com algumas particularidades inerentes a cada desenho experimental, foi verificado o desenvolvimento, em mais de 90% dos animais, de CCE em tempo semelhante ao utilizado neste estudo. No estudo de Yin et al.³, foram utilizados camundongos C57BL/6, indução com 4NQO por 10 semanas seguidas de 14 semanas de observação, em um dos seus grupos, mesmo com a prevenção química realizada, 94,4% dos animais foram diagnosticados com CCE ao final do estudo. Já em Vincent-Chong et al.¹³, foram separados grupos de camundongos fêmeas da espécie, C57BL/6, que ingeriram 4NQO por 16 semanas e observados por mais 16 semanas, e conclui-se que a partir da 28ª semana ambos os grupos desenvolveram displasia severa e CCE em mais de 90% dos animais. Desse modo, o desenvolvimento de CCE e de lesões

potencialmente malignas ocorreram de forma similar a este estudo, usando a mesma concentração e período de indução e de observação semelhantes.

4. CONCLUSÃO

Ao final deste estudo foi possível concluir que o 4NQO atua nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese química, portanto é um carcinógeno completo, sendo capaz de produzir displasias e carcinomas de células escamosas na língua dos camundongos C57BL/6, utilizando a concentração de 100 µg/ml por 14 semanas, sem o período de observação. Ademais, a indução com concentração de 100 µg/ml por 14 semanas com o período de observação de 9 semanas (grupo 1B) foi suficiente para desenvolver CCE na língua de 100% dos animais que participaram do experimento. No entanto, ao realizar a indução sem o período de observação o percentual foi para 66,6% de CCE, tendo 33,4% de lesões displásicas (potencialmente malignas). Portanto, é possível concluir que interromper a indução carcinogênica e realizar o período observação, ou seja, cessar a agressão direta com o 4NQO no epitélio da língua dos camundongos, não impede a progressão de lesões potencialmente malignas. Assim sendo, para se obter êxito no desenvolvimento de CCE, tanto a concentração do carcinógeno quanto o tempo de indução e de observação são de suma importância.

5. CONTRIBUIÇÕES

Todos os autores contribuíram substancialmente na concepção e/ou no planejamento do estudo, na obtenção, na análise ou na interpretação dos dados, na redação ou na revisão crítica e aprovaram a versão final a ser publicada.

6. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

7. FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente estudo foi realizado com apoio da COPES/POSGRAP/UFS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos JCS, Rocha CEMC, Costa REAR da, et al. Avaliação Clínico-epidemiológica de Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 15 de fevereiro de 2022;68(1):e-141584.
2. Guedes C do CFV, Santana RC, Leles AC. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: uma revisão de literatura. *Scientia Generalis*. 23 de outubro de 2021;2(2):165–76.
3. Glathar AR, Oyelakin A, Nayak KB, et al. A Systemic and Integrated Analysis of p63-Driven Regulatory Networks in Mouse Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. janeiro de 2023;15(2):446.
4. Yin P, Chen J, Wu Y, et al. Chemoprevention of 4NQO-Induced Mouse Tongue Carcinogenesis by AKT Inhibitor through the MMP-9/RhoC Signaling Pathway and Autophagy. *Analytical Cellular Pathology*. 2022;2022(1):3770715.
5. Li J, Liang F, Yu D, et al. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 1o de abril de 2013;49(4):299–305.
6. Liu YC, Ho HC, Lee MR, et al. Cortactin is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma and its overexpression is involved in oral carcinogenesis. *Environ Toxicol*. março de 2017;32(3):799–812.
7. Yao J, Cui Q, Fan W, et al. Single-cell transcriptomic analysis in a mouse model deciphers cell transition states in the multistep development of esophageal cancer. *Nat Commun*. 24 de julho de 2020;11(1):3715.
8. Miki K, Orita Y, Gion Y, et al. Regulatory T cells function at the early stage of tumor progression in a mouse model of tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 1o de novembro de 2016;65(11):1401–10.
9. Miki K, Orita Y, Gion Y, et al. Tumor-Associated Macrophages in the Development of 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Tongue Squamous Cell Carcinoma in a Mouse Model. *Oncology*. 21 de junho de 2017;93(3):204–12.
10. Barnes L, W Eveson J, Reichart P, et al. editores. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: IARC; 2005.
11. Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *The Journal of Pathology*. 2001;194(3):294–7.
12. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. março de 2008;37(3):127–33.

13. Vincent-Chong VK, DeJong H, Rich LJ, et al. Impact of Age on Disease Progression and Microenvironment in Oral Cancer. *J Dent Res.* outubro de 2018;97(11):1268–76.
14. Sagheer SH, Whitaker-Menezes D, Han JYS, et al. 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *Methods Cell Biol.* 2021;163:93–111.
15. Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology.* 1o de agosto de 2006;42(7):655–67.
16. Maria Leticia de Almeida LANÇA KAS. Protocolo para estudo da progressão da leucoplasia oral em modelo pré-clínico. Protocolo para estudo da progressão da leucoplasia oral em modelo pré-clínico. 27 de abril de 2023;51(Especial):0–0.
17. Chu M, Su YX, Wang L, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to oral cancer progression in 4NQO-treated mice. *Oral Dis.* janeiro de 2012;18(1):67–73.
18. Stashenko P, Yost S, Choi Y, et al. The Oral Mouse Microbiome Promotes Tumorigenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *mSystems.* 6 de agosto de 2019;4(4):e00323-19.
19. Ciena AP, Bolina C de S, de Almeida SRY, et al. Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*asyprocta aguti* Linnaeus, 1766). *Journal of Anatomy.* 2013;223(2):152–8.
20. Watanabe IS, Dos Santos Haemmerle CA, Dias FJ, et al. Structural characterization of the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) tongue by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Microscopy Research and Technique.* 2013;76(2):141–55.
21. Ciena AP, Santos AC dos, Vasconcelos BG, et al. Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Acta Zoologica.* 2019;100(1):53–60.
22. Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, et al. 4NQO carcinogenesis: A mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head & Neck.* 1994;16(5):424–32.
23. Rivera Martínez CA. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Morphol.* Mar 2012;30(1):309-14.
24. Stevens A, Lowe J. *Anatomía Patológica.* 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2001.
25. Ribeiro DA, Grilli DG, Salvadori DMF. Genomic instability in blood cells is able to predict the oral cancer risk: an experimental study in rats. *J Mol Hist.* 1o de outubro de 2008;39(5):481–6.

26. Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. Oral Oncol. abril de 2005;41(4):337–9.

9. ANEXOS

Tabela 1 - Alterações histopatológicas encontradas nas línguas dos camundongos do experimento realizado durante 14 semanas. Grupo experimento: indução com 4NQO em 6 animais por 14 semanas (grupo 1A); grupo controle: 6 animais observados por 14 semanas (grupo 2A).

Experimento realizado por 14 semanas			
Grupo 1A (experimento)		Grupo 2A (controle)	
Camundongos	Análise histopatológica	Camundongos	Análise histopatológica
C1	CCE	C1	Sem alterações
C2	Displasia leve	C2	Sem alterações
C3	Displasia leve	C3	Sem alterações
C4	CCE	C4	Sem alterações
C5	CCE	C5	Sem alterações
C6	CCE	C6	Sem alterações

CCE – carcinoma de células escamosas

Fonte: Autoria própria, 2023.

Tabela 2 - Alterações histopatológicas encontradas nas línguas dos camundongos do experimento realizado por 14 semanas com período de observação de 9 semanas. Grupo experimento: indução com 4NQO em 6 animais por 14 semanas e observação por 9 semanas (grupo 1B); grupo controle: 6 animais observados por 23 semanas (grupo 2B).

Experimento realizado por 23 semanas			
Grupo 1B (experimento)		Grupo 2B (controle)	
Camundongos	Análise histopatológica	Camundongos	Análise histopatológica
C1	CCE	C1	Sem alterações
C2	CCE	C2	Sem alterações
C3	CCE	C3	Sem alterações
C4	CCE	C4	Sem alterações
C5	CCE	C5	Sem alterações
-	-	C6	Sem alterações

CCE – carcinoma de células escamosas

- : Eutanásia no início do experimento, por lesão em briga com os outros animais.

Fonte: Autoria própria, 2023.