



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

MATHEUS RIBEIRO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO ESTÍMULO INFLAMATÓRIO NA CARCINOGENESE
ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL HISTOMORFOLÓGICO**

ARACAJU

2015

MATHEUS RIBEIRO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO ESTÍMULO INFLAMATÓRIO NA CARCINOGENESE
ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL HISTOMORFOLÓGICO**

Artigo apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à conclusão do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Rabello Piva

ARACAJU

2015

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
METODOLOGIA	8
COMITÊ DE ÉTICA	8
INDUÇÃO COM CARCINÓGENO 4NQO	8
ESTÍMULO INFLAMATÓRIO	9
ANIMAIS	9
INDUÇÃO, ESTÍMULO INFLAMATÓRIO E EUTANÁSIA	9
ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	10
HISTOLOGIA	10
ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
RESULTADOS	11
A) ANÁLISE MACROSCÓPICA	11
B) ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	12
C) ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
ANEXO	24
A) DECLARAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA	24

A INFLUÊNCIA DO ESTÍMULO INFLAMATÓRIO NA CARCINOGENESE ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL

Matheus Ribeiro **dos Santos**¹; Vanessa Meneses **Vieira**²; Marta Rabello **Piva**³;

Universidade Federal de Sergipe – UFS, Aracaju, SE, Brasil.

¹ mateurs14@hotmail.com, R. Lênio de Moura Moraes, 250, Bl 10 Apto 201, 49031-040, Aracaju/SE, (79) 3248-6492; ² vanessaspmvieira @hotmail.com; ³ martarpiva@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: A inflamação é uma resposta natural do organismo contra infecções ou lesão tecidual, com o objetivo de reparar tais danos. Tem-se sugerido que estímulos inflamatórios influenciam no crescimento e desenvolvimento das lesões tumorais.

Objetivo: Avaliar a influência do estímulo inflamatório na carcinogênese oral.

Material e Método: Foi realizado estudo experimental em ratos *Wistar* os grupos foram divididos de acordo com o tempo de eutanásia (dois grupos de quinze semanas e dois de trinta e três semanas) que foram induzidos com 4NQO, sendo que um grupo de cada tempo recebeu um estímulo inflamatório no decorrer da carcinogênese. Diferenças entre tipo de lesões clínicas, grau de displasia epitelial e invasão celular e intensidade do infiltrado inflamatório foram avaliadas. **Resultado:** Nos grupos de trinta e três semanas houve diferença estatisticamente significativa dos escores médios de displasia epitelial, invasão em 100% dos casos como o infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso. **Conclusão:** O estímulo inflamatório não alterou o nível de displasia, entretanto pode ter efeito sobre o grau de invasão e intensidade/qualidade do infiltrado inflamatório.

Descritores: Inflamação; Carcinogênese; Displasia; Câncer;

THE INFLUENCE OF INFLAMMATORY STIMULUS IN ORAL CARCINOGENESIS: EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is a natural response of the body against infection or tissue injury, in order to repair such damage. It has been suggested that inflammatory stimuli influence the growth and development of tumor lesions. **Objective:** To evaluate the consequences of the inflammatory stimulus in oral carcinogenesis. **Material and Methods:** an experimental study was conducted in Wistar rats with control groups (G0, G1A and G1B) and testing (G2A and G2B), where G1A and G2A groups were induced for 15 weeks and G1B and G2B groups for 33 weeks, both with 4NQO, and the test groups, in addition to induction, received an inflammatory stimulus during carcinogenesis. Differences between type of clinical lesions, degree of epithelial dysplasia and cell invasion were evaluated. **Result:** There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) for the mean score of epithelial dysplasia among G1B groups (50.8) and G2B (41.8). The invasion was present in 100% of cases induced for 33 weeks as well as the inflammatory infiltrate. **Conclusion:** The inflammatory stimulus did not change the level of dysplasia, however can have an effect on the degree of invasion and intensity / quality of the inflammatory infiltrate.

Keywords: Inflammation; carcinogenesis; cancer.

INTRODUÇÃO

O câncer de boca é a décima primeira malignidade mais comum no mundo, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) o tipo histológico predominante. A maior incidência é observada na Índia, Austrália, Brasil, França e África do Sul. O diagnóstico e o tratamento em estágios iniciais ainda permanecem associados a uma maior taxa de cura considerando-se os tratamentos atualmente disponíveis (Mehrotra & Yadav¹).

A carcinogênese é um processo dinâmico que consiste no desenvolvimento de uma neoplasia maligna, compreendido desde as alterações mais precoces a nível molecular, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo do hospedeiro. Na tentativa de promover a carcinogênese oral em animais, vários carcinógenos químicos já foram utilizados. Hoje, sabe-se que o 4-Nitroquinoline-1-Oxido (4NQO), substância sintética solúvel em água, é o melhor carcinógeno disponível no mercado para a produção de tumorigênese em ratos. Estudos comprovam que o 4NQO é capaz de produzir todas as fases da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) em modelo animal. Acredita-se que sua efetividade está ligada ao 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO), metabólito carcinogênico que atua na formação de adutos de DNA através de um forte estresse oxidativo intracelular. O 4HAQO pode ser metabolizado dando origem ao complexo seril-AMPenzima, o qual tem a capacidade de introduzir grupos quinolonas dentro do DNA, potencializando o dano ao material genético (Montenegro *et al*²).

Há na literatura divergências quanto ao papel da inflamação na carcinogênese oral, pois enquanto para que alguns pesquisadores o infiltrado inflamatório funciona como defesa do hospedeiro no desenvolvimento de lesões malignas como o carcinoma de células escamosas orais (CCEO), outros acreditam que ele possa atuar na

transformação e progressão tumoral. A inflamação, frequentemente presente no CCEO, é considerada uma resposta protetora do organismo cujo objetivo é livrá-lo da causa inicial da lesão, porém, estudos têm demonstrado que a ação intermitente ou descontrolada de citocinas que participam do processo inflamatório são capazes não só de transformar como de induzir à progressão, invasão e metástase das células neoplásicas (Agarwal *et al.*³) e de alguns tipos celulares que participam do controle da inflamação e defesa antitumoral.

Existem evidências de que a inflamação, provocada por uma biópsia incisional ou por traumas semelhantes, pode estimular a transformação e/ou progressão das células tumorais, e que é real a possibilidade de promoção do crescimento tumoral acarretado pela resposta inflamatória e pelo processo de reparo. (Piva, Souza *et al.*⁴).

A ideia fundamental é que a inflamação normal – ou seja, a associada a cicatrização de feridas – é geralmente autolimitada; no entanto, a desregulação de qualquer um dos fatores pode levar a anormalidade e, em última instância, a patogênese. Este parece ser o caso durante a progressão neoplásica (Coussens *et al.*⁵). Entretanto, ainda não está claro se essa resposta inflamatória pode ter algum impacto na progressão tumoral ainda na fase da carcinogênese.

A proposta do presente estudo foi induzir a carcinogênese oral em ratos *Wistar* com aplicações de carcinógeno e realização de estímulo inflamatório para observar o efeito da inflamação na carcinogênese oral.

METODOLOGIA

Comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob processo nº 33/2013 da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Indução com carcinógeno 4NQO

Para aplicação do carcinógeno químico foi utilizado o 4NQO (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA) diluído em propilenoglicol (veículo oleoso) numa concentração de 0,7% (Monteiro *et al.*⁷), sendo armazenado na geladeira. Os animais eram imobilizados, a abertura da boca realizada com pinça clínica e a região a ser induzida foi seca com cotonete previamente a utilização do carcinógeno. As aplicações químicas foram induzidas no dorso da língua dos animais 3 vezes por semana em dias alternados com um pincel 3-0 (um para cada grupo) e cada animal foi induzido com 100 µL. Essa solução era armazenada em tubos de ensaio envolvido com papel alumínio (já que o 4NQO é fotossensível), mantido a 4°C e sempre agitados antes do uso para homogeneizar a substância. Ao fim de cada aplicação, os animais foram privados de água por 5 horas para permitir maior tempo de contato do carcinógeno químico com a mucosa oral. É importante ressaltar que o período de indução corresponde ao tempo de aplicação do 4NQO mais o tempo de espera. Sendo que o tempo de indução engloba todas as fases da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão). A exposição a um carcinógeno e as alterações permanentes provocadas por ele na sua interação com DNA (ácido desoxirribonucleico) da célula corresponde à iniciação. A célula alterada pode ser eliminada do organismo por mecanismos homeostáticos ou desenvolver outras alterações, na dependência de novos estímulos. Promoção, após a lesão inicial, as células iniciadas, se submetidas aos agentes promotores, viriam a apresentar os efeitos

carcinogênicos. Como estes agentes não são mutagênicos, seus efeitos podem ser reversíveis numa fase inicial e somente uma exposição prolongada poderia induzir efetivamente o processo de carcinogênese; progressão, o processo pelo qual são ultrapassados os mecanismos que regulam a replicação celular, assim como sua organização espacial, estabelecendo-se o fenótipo maligno (INCA ⁶).

Estímulo inflamatório

O estímulo inflamatório consiste em uma pequena incisão com cerca de 2mm (tamanho e profundidade), feita com lâmina de bisturi nº 11, no dorso da língua do lado direito, por um só operador.

Animais

Foram utilizados um total de 21 ratos *Wistar*, fêmeas, com massa corporal aproximadamente 130±30g (idade média de 100 dias). Os animais permaneceram em gaiolas plásticas coletivas, medindo 40 x 33 x 17 cm, com tampa de grade metálica, por onde a água e ração balanceada (Purina Labina) foram fornecidas *ad libitum*. As gaiolas eram forradas com maravalha, as quais eram trocadas 3 vezes por semana. A temperatura era mantida em 22°C com período de claro e escuro de 12 horas, sendo mantidos em experimentação no Biotério do Laboratório de Histologia no Departamento de Morfologia em condições de luz, temperatura e alimentação padrões.

Indução, estímulo inflamatório e eutanásia

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos da seguinte maneira: dois grupos controle, constituídos por 3 animais cada: (G0), os quais não tiveram nenhum procedimento realizado, sendo eutanasiados com 33 semanas; (G1), subdividido em G1A e G1B, submetidos à aplicação do 4NQO por 9 e 15 semanas e eutanasiados ao final da 15ª e 33ª semana, respectivamente. E um grupo teste (G2), subdividido em G2A e G2B, constituídos por 6 animais cada e submetidos à aplicação

do 4NQO por 9 e 15 semanas, respectivamente. Para realização do Estímulo Inflamatório houve no G2A tempo de espera de 4 semanas após o término da aplicação de 4NQO, seguido de um tempo de espera de 2 semanas após a incisão na língua, sendo eutanasiados ao final da 15ª. No G2B o tempo de espera foi de 11 semanas após o término da aplicação de 4NQO, seguido de um tempo de espera de 6 semanas após a incisão, sendo eutanasiados ao final da 33ª semana (Tabela 1).

Os ratos foram eutanasiados por punção cardíaca sob anestesia (Tiopental, 100mg/Kg, aplicado por via intraperitoneal) e o sangue colhido para posterior detecção de citocinas inflamatórias (parte de outro estudo).

Análise macroscópica

As línguas de todos os animais foram fotografadas previamente à indução e após a eutanásia. Nessas etapas, foi avaliada a presença de lesões classificadas como: placas brancas, placas eritematosas e lesões verrucosas.

Histologia

Para análise histológica as línguas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Após 24 horas, as línguas foram seccionadas ao meio, processadas e incluídas em parafina. Os blocos foram então seccionados em corte de 5 µm e, posteriormente, corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE).

A classificação histológica das hiperplasias e displasias foi baseada na Classificação de Smith & Pindborg⁸ (Tabelas 4 e 5), pois é a única que fornece escores para efeito de estatística. O Infiltrado Inflamatório foi classificado em Leve, Moderado e Intenso. A taxa de invasão foi classificada em micro invasão (+) e invasão (++). (Tabela 3)

Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o ANOVA, com pós-teste de Tukey e nível de significância de 5% para avaliação dos escores de displasias. Para os demais dados, foi realizada análise descritiva.

RESULTADOS

A) ANÁLISE MACROSCÓPICA

O desenvolvimento do câncer oral é um processo de vários estágios, que inclui uma sequência de alterações que vão da hiperplasia ao carcinoma, podendo ser representadas clinicamente por placas brancas, placas eritematosas, lesões verrucosas ou lesões ulceradas (Tabela 3).

As línguas dos ratos correspondentes ao grupo G0 não apresentaram alterações, pois não sofreram nenhum tipo de procedimento. Dos ratos correspondentes ao grupo G1A, apenas um deles apresentou lesão verrucosa na língua (Quadro 1A). Do grupo G1B, em todos os ratos foram detectadas lesões de um ou mais tipos. As lesões de dorso, geralmente eram placas brancas, algumas verrucosas, poucas se apresentavam em forma de placa eritematosa. A borda lateral e ventre lingual, geralmente, foram afetados por placas eritematosas, apesar de um animal (R1) apresentar lesão verrucosa no ventre lingual (Quadro 1B). Do grupo G2A, em dois ratos apareceram lesões esbranquiçadas no dorso ou ventre lingual (Quadro 1C), sem a presença de lesões verrucosas ou placas eritematosas. Já os ratos do grupo G2B, apresentaram lesões esbranquiçadas, verrucosas/ placas eritematosas (Quadro 1D).

B) ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

No grupo G0, não houve displasia epitelial oral (DEO) ou carcinoma de células escamosas (CCEO). Na classificação das displasias, conforme Smith & Pindborg⁸, o grupo G1A, com 15 semanas de indução, apresentou escores entre 25 a 37, uma média de 30,1. Portanto, a DEO nesse grupo foi classificada entre leve e moderada (Quadro 1E). O grupo G1B, com 33 semanas de indução, apresentou escores de DEO mais altos, com uma média de 50,8, além de todos os ratos apresentarem CCEO micro invasivo (Quadro 1F). O grupo G2A, com 15 semanas de indução e estímulo inflamatório, os escores variaram entre 23 e 35, com uma média de 29,8. A DEO desse grupo foi classificada entre leve e moderada (Quadro 1G). No grupo G2B, com 33 semanas de indução e estímulo inflamatório, os escores variaram de 34 a 52, com uma média de 41,8, apresentando assim, casos de DEO entre moderada e severa (Quadro 1H). Neste grupo, houve invasão em 100% dos casos, sendo 40% micro invasivo (Tabela 3).

O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os cortes avaliados, exceto o grupo G0, sendo que nos grupos controles, ele se manifestava de forma que variava de leve ao moderado (Tabela 3).

C) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação dos escores médios entre os grupos G1A (30,1), G1B (50,8), G2A (29,8) e G2B (41,8), houve diferença significativa entre os grupos G1B x G2B ($p < 0,05$), entretanto não houve entre G1A x G2A ($p < 0,05$) indicando que o estímulo inflamatório não teve efeito sobre o nível de atípia celular.

DISCUSSÃO

Segundo o INCA⁶, as alterações celulares que resultam da exposição da mucosa bucal aos agentes cancerígenos, inicialmente se manifestam por lesões inflamatórias inespecíficas. Se esta agressão é intensa e prolongada, levará ao desenvolvimento das displasias. Estas podem evoluir desde um grau leve até um grau intenso e, finalmente, para o carcinoma. Portanto, podemos considerar o carcinógeno como iniciador e a inflamação crônica como promotora, caso não seja eliminada. No entanto, para ser capaz de funcionar como promotor, o infiltrado inflamatório deve passar por uma seleção natural requerida pelo meio, e produzir citocinas transformadoras, por um tempo prolongado (promoção), chegando a um ponto em que as alterações tornam-se irreversíveis e passam para a fase de progressão.

Segundo Matkowskyj *et al.*⁹, a inflamação crônica é um fator de risco bem reconhecido para o desenvolvimento do câncer humano (INCA¹⁰), e ao menos um terço de todos os cânceres humanos têm sido associados à inflamação, através das citocinas inflamatórias secretadas, dentre elas, TNF- α , Interleucinas (IL-1 β , IL-6) e GM-CSF (Sakthivel *et al.*¹¹), as quais podem induzir a proliferação celular, um processo que aumenta o risco de formação de célula anormal e o desenvolvimento do câncer.

Estímulos inflamatórios como traumas mecânicos ou procedimentos invasivos, como biópsias, induzem no tecido uma reação inflamatória aguda e o recrutamento de células inflamatórias, bem como a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estimular a progressão do tumor (Szalayova *et al.*¹²; Walter *et al.*¹³). Sugere-se, então, que após tal estímulo ocorra uma exacerbação de mediadores e células inflamatórias que podem contribuir ainda mais para o desenvolvimento do câncer.

No presente estudo, analisando macroscopicamente os grupos G1A e G2A (sem e com estímulo inflamatório, respectivamente, e ambos com 15 semanas de indução) foi possível observar que no primeiro grupo, apenas um rato (33,33%) apresentou lesão clínica (lesão verrucosa em bordo lateral de língua) concordando com Dayan *et al.*¹⁴, que não observaram lesões clínicas aparentes, com Vered *et al.*¹⁵, segundo os quais seria necessário um tempo de indução de no mínimo 20 semanas e discordando de Ribeiro, Salavadori¹⁶, que encontraram na superfície dorsal da língua de ratos áreas brancas e ásperas depois de 12 semanas de indução com 4NQO. Já no segundo grupo, após o estímulo inflamatório, somente dois ratos (33,33%) apresentaram lesões esbranquiçadas no dorso ou ventre lingual.

Nos cortes histológicos das línguas de ratos, corados em HE, observou-se o desenvolvimento de alterações epiteliais de quase todas as fases do processo de carcinogênese: hiperplasia, displasia moderada, displasia severa e carcinoma de células escamosas. Sendo assim, o potencial indutivo do 4NQO em diferentes períodos, mostrou-se eficaz, conforme aponta o trabalho de Suwa, *et al.*¹⁷

Associando os achados clínicos com o histológico, onde tanto G1A quanto G2A apresentaram DEO moderada em 66,66% dos casos, pode-se sugerir que o estímulo inflamatório não causou diferença significativa na progressão da lesão, tanto em nível macroscópico como microscópico.

Nos grupos G1B e G2B (sem e com Estímulo Inflamatório, respectivamente, e ambos com 33 semanas de indução), pôde-se observar que no primeiro grupo todos os ratos apresentaram lesões clínicas de um ou mais tipos: placas brancas/eritematosas (66,66%) e lesões verrucosas (33,33%). Já no segundo, 100% dos ratos apresentaram placas brancas/eritematosas e três ratos (60%) apresentaram lesões verrucosas. Do ponto de vista histológico, o grupo G1B apresentou CCEO micro invasivo em 100%

dos casos, assemelhando-se ao estudo de Minicucci *et al.*¹⁸ que obtiveram DEO moderada e severa (30% dos casos) e CCEO (70% dos casos) em 20 semanas. No grupo G2B, todos os casos foram CCEO, destes 40% foram micro invasivos e 60% invasivos. Com relação ao nível de DEO, o G1B apresentou 100% de DEO Severa, enquanto o G2B apresentou apenas 20% de DEO Severa e 80% de DEO Moderada. Estatisticamente houve diferença entre G1B e G2B, sendo que o primeiro apresentou nível maior de alterações. Sugere-se, então, que o estímulo inflamatório não teve influência sob o nível de diferenciação da lesão, visto que todos foram Carcinoma de Células Escamosas Grau I, nem sob o grau de alteração epitelial, entretanto pode ter influência sob os fatores ligados a invasão.

É importante ressaltar que no G2A, o estímulo inflamatório foi aplicado antes do aparecimento de lesões. Isso pode ter influenciado no resultado da pesquisa, já que no G2B, tal estímulo levou à progressão tumoral, com invasão.

Tal semelhança entre os escores de DEO podem estar relacionados ao estágio de desenvolvimento da lesão no momento do estímulo inflamatório. Como não foi possível determinar a exata fase da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) no momento do procedimento, talvez este tenha sido realizado em um estágio onde a inflamação não tenha tanta influência sobre a progressão da lesão.

Observa-se ainda que a presença de CCEO não está ligada necessariamente a DEO Severa, visto que 80% dos animais do G2B apresentaram lesões de escores compatíveis com DEO Moderada, associadas à CCEO. Portanto, a presença de invasão não está relacionada ao grau de displasia, dado que em G2B dos animais com DEO Moderada todos apresentaram invasão sendo esta mais severa em 50% dos ratos.

Logo, apesar das displasias serem classificadas em leve, moderada e severa, sugerindo graus de agressividades em direção a uma lesão invasiva, até hoje, não

existem provas de que a invasão só ocorre a partir da DEO Severa. É bem provável que o tipo de infiltrado inflamatório e a capacidade das células produzirem citocinas específicas sejam fatores cruciais na invasão precoce ou tardia, embora o tipo de carcinógeno também possa estar relacionado ao processo seletivo das células inflamatórias.

Estabelecendo uma relação entre intensidade do infiltrado inflamatório e grau de invasão entre os grupos G1B e G2B (sem e com Estímulo Inflamatório, respectivamente, e ambos com 33 semanas de indução), observa-se que no primeiro grupo 100% dos animais apresentaram CCEO micro invasivo, bem como infiltrado inflamatório de Leve à Moderado. Porém, no segundo grupo 60% dos animais apresentaram CCEO invasivo e infiltrado inflamatório Moderado à Intenso. Pode-se sugerir, neste caso, que a intensidade da inflamação (maior no grupo com Estímulo Inflamatório) possa ter alguma influência no grau de invasão. Hobson *et al*¹⁹, demonstrou em modelo animal de câncer de mama que estímulos inflamatórios como biópsias provocam uma reação inflamatória local e pode provocar um aumento da invasão e do risco de metástases. Entretanto, Piva, *et al.*⁴ ressaltam a importância de entender a qualidade e não a quantidade do infiltrado inflamatório, visto que a invasão e a metástase estão ligadas a citocinas e fatores específicos.

Sugere-se a realização de estudos com amostras mais relevantes, associada a ensaios imunoenzimáticos para a comprovação do real papel do estímulo inflamatório no desenvolvimento da carcinogênese oral, assim como aplicação do estímulo só após o aparecimento de lesões.

CONCLUSÃO

Sugere-se que o estímulo inflamatório não tenha influência sobre o nível de DEO antes do aparecimento de lesões, durante a carcinogênese, entretanto pode existir uma relação entre o processo de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório adjacente.

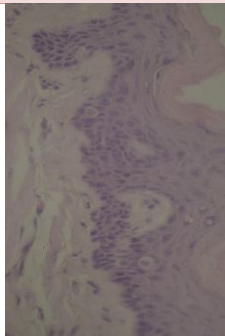
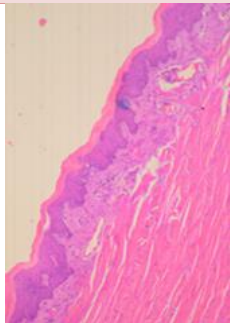
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

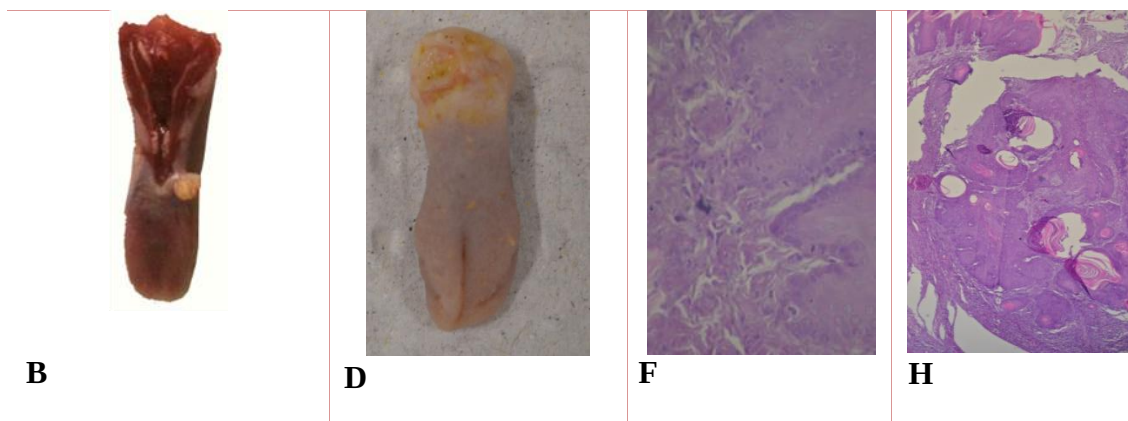
1. Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer*. 2006; 46, n. 2, 60-66.
2. Montenegro MR, FRANCO M. *Patologia: Processos gerais*. 4.Ed. São Paulo: Atheneu. 2008; 320p.
3. Aggarwal BB, *et al.* Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical pharmacology*. 2006; v.72, p.1605-1621.
4. Piva MR, Souza LB, Martins Filho PRS, Nonaka CFW, Santos TS, Andrade ESS, Piva D. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. *Oncology Letters*. 2013; v. 5, p. 1909-1914.
5. COUSSENS LM, *et al.* Inflammation and Cancer. *Nature*. 2002.
6. INCA -Instituto Nacional do Câncer. *Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA*. INCA. 2002. [acesso 11 mar 2014]. Disponível em: www.inca.gov.br
7. Monteiro JSDC, Pinheiro NA, De Oliveira SC, Aciole GT, Sousa JA, Canguss MC, *et al.* Influence of laser phototherapy (lambda660 nm) on the outcome of oral chemical carcinogenesis on the hamster cheek pouch model: histological study. *Photomedicine and laser surgery*. 2011; v.29, n.11, p. 741-745.

8. Smith CJ, Pindborg JJ. Histological grading of oral epithelial atypia - by using photographic standards. Copenhagen: WHO reference centre for oral precancerous conditions. 1969.
9. Matkowskyj KA, Chen ZE, Rao MS, Yang GY. Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease: molecular pathogenesis to morphology. Arch. Pathol. Lab. Med. 2013; v.137, n.3, p. 338–350.
10. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. INCA. 2014. [acesso 9 jun 2014]. Disponível em: www.inca.gov.br
11. Sakthivel MK, Guruvayoorappan C. Acacia ferruginea Inhibits Tumor Progression by Regulating Inflammatory Mediators-(TNF- α , iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2, GM-CSF) and Pro-Angiogenic Growth Factor- VEGF. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013; v. 14, n. 6, p. 3909-3919.
12. Szalayova G, *et al.* A framework for the role of acute inflammation in tumor progression. Breast Cancer Res. Treat. 2015; 151:235-236.
13. Walter ND, *et al.* Wound healing after trauma may predispose to lung cancer metastasis: review of potential mechanisms. Am. J. Respir. Cell Mol. Bio. 2011; 44(5): 591-596.
14. Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental Tongue Cancer in Desalivated Rats. Oral Oncology, 1997. Vol. 33, No 2, pp 105-109
15. Vered M, Yaron N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. Oral Oncology. 2005; 41: 337-339.

16. Ribeiro DA, Salvadori DMF. Gingival Changes in Wistar Rats after Oral Treatment with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *European Journal Of Dentistry*. 2007;1:152-157.
17. Suwa H, Hirano M, Kawarada K, Nagayama M, Ehara M, Muraki T, et al. Pthlh, a promising cancer modifier gene in rat tongue carcinogenesis. *Oncology reports*. 2014; v.31, n.1, p. 03-12.
18. Minicucci EM, Ribeiro DA, da Silva GN, Pardini MI, Montovani JC, Salvadori DM. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2011;63(5):483-9.
19. Hobson J, *et al*. Acute inflammation induced by biopsy of mouse mammary tumors promotes the development of metastasis. *Brest Cancer Res Treat*. 2013; 139(2):391-401.

Quadro 1: Aspectos clínicos e histológicos

CLÍNICO		HISTOLÓGICO	
G1A	G2A	G1A	G2A
			
A	C	E	G
G1B	G2B	G1B	G2B



A) Lesão exofítica na borda lateral esquerda da língua do rato R2 do grupo G1A; **B)** Lesão exofítica verrucosa no ventre lingual do rato R1 do grupo G1B; **C)** Lesão esbranquiçada no dorso lingual do rato R3 e ventre lingual do rato R1, respectivamente, do grupo G2A. Lesão esbranquiçada no dorso lingual do rato R3 e ventre lingual do rato R1, respectivamente, do grupo G2A; **D)** Lesão esbranquiça com áreas eritematosas no dorso lingual do rato R4 do grupo G2B; **E)** DEO moderada no rato R2 do grupo G1A no aumento de 100x; **F)** Invasão no rato R2 do grupo G1B no aumento de 200x; **G)** DEO moderada no rato R3 do grupo G2A no aumento de 100x. **H)** Invasão no rato R3 do grupo G2B no aumento de 200x.

TABELA 1 – Metodologia específica para cada grupo

^o N° RATOS	4NQO	ESPERA	EI	ESPERA	EUTANÁSIA
G0 (3)	SEM	22 S	SEM	SEM	33 S
G1A (3)	9 S	6 S	SEM	SEM	15 S
G2A (6)	9 S	4 S	COM	2 S	15 S
G1B (3)	16 S	17 S	SEM	SEM	33 S
G2B (6)	16 S	11 S	COM	6 S	33 S

EI: Estimulo Inflamatório provocado por lâmina de bisturi na língua. Espera: Período no qual os ratos não sofreram nenhum tipo de intervenção.

Tabela 2 – Escores das displasias com 15 e 33 semanas de indução, conforme classificação de Smith & Pindborg, 1969.

GRUPOS	4NQO	R1 GD/ES	R2 GD/ES	R3 GD/ES	R4 GD/ES	R5 GD/ES	R6 GD/ES
G0	NÃO	N/0	N/0	N/0	-	-	-
G1A	15S	DL/25	DM/29	DM/37	-	-	-

G1B	33S	DS/52	DS/51	DS/50	-	-	-
G2A	15S	DL/23	DM/31	DL/25	DM/35	DM/35	DM/30
G2B	33S	DM/38	DS/52	DM/34	DM/40	DM/45	-

S: Semanas; GD: grau de displasia; ES: escore; N: normal; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; (-): animal excluído da pesquisa.

Tabela 2 – Resultados finais

GRUPOS	G0		G1A		G1B		G2A		G2B	
4NQO	-		15S		33S		15S (EI)		33S (EI)	
R1	E	-	E	25L	E	52S	E	23L	E	38M
	LC	-	LC	-	LC	VE	LC	-	LC	PB\ ERI
	IV	-	IV	-	IV	+	IV	-	IV	+
	II	-	II	LM	II	LM	II	LM	II	LM
R2	E	-	E	29M	E	51S	E	31M	E	52S
	LC	-	LC	VE	LC	ERI/ PB	LC	-	LC	PB\ VE
	IV	-	IV	+	IV	+	IV	-	IV	++
	II	-	II	LM	II	LM	II	LM	II	MI
R3	E	-	E	37M	E	50S	E	25L	E	34M
	LC	-	LC	-	LC	ERI/ PB	LC	PB	LC	PB\ VE
	IV	-	IV	-	IV	+	IV	-	IV	+
	II	-	II	LM	II	LM	II	LM	II	LM
R4	E	-	E	-	E	-	E	35M	E	40M
	LC	-	LC	-	LC	-	LC	-	LC	PB\ ERI
	IV	-	IV	-	IV	-	IV	+	IV	++
	II	-	II	-	II	-	II	MI	II	MI

R5	E	-	E	-	E	-	E	35M	E	45M
	LC	-	LC	-	LC	-	LC	PB	LC	VE
	IV	-	IV	-	IV	-	IV	+	IV	++
	II	-	II	-	II	-	II	MI	II	MI
R6	E	-	E	-	E	-	E	30M	E	-
	LC	-	LC	-	LC	-	LC	-	LC	-
	IV	-	IV	-	IV	-	IV	-	IV	-
	II	-	II	-	II	-	II	LM	II	-

S: Semanas; CORT: Corticóide; E: Escore; LC: Lesão Clínica; IV (+): micro invasão; IV(++): invasão; II: Infiltrado Inflamatório; M: Mastócitos; VE: Verrucosa; ERI: Eritematosa; PB: Placa Branca.

CLASSIFICAÇÃO DAS HIPERPLASIAS E DISPLASIAS (SMITH & PINDBORG, 1969). (Tabelas 4 e 5)

Tabela 4 - Critérios utilizados para avaliação das alterações morfológicas.

ALTERAÇÕES	AUMENTO	SCORES
1-Projeções em gota	10x	0/2/4
2-Estratificação irregular	10x	0/2/6
3-Queratinização abaixo da camada de queratina	10x	0/2/5
4-Hiperplasia da camada basal	10x	0/1/3
5-Perda de adesão intercelular	10x	0/1/4
6-Perda de polaridade	10x	0/2/6
7-Hipercromatismo nuclear	10x	0/2/5
8-Relação núcleo/citoplasma alterada	40x	0/2/6
9-Anisocitose e anisocariose	40x	0/2/6
10-Pleomorfismo celular e nuclear	40x	0/2/6

11-Atividade mitótica	40x	0/1/5
12-Nível de atividade mitótica (localização)	40x	0/3/10
13-Mitoses atípicas	40x	0/6/10

1º escore: ausência de alteração; 2º escore: pouca alteração; 3º escore: muita alteração.

Tabela 5 - Cálculo do Índice de Displasia Epitelial.

ESCORES	GRAUS
0 – 10	Hiperplasias
11 – 25	Displasia Leve
26 – 45	Displasia Moderada
46 – 75	Displasia Severa ou Ca <i>in situ</i>

ANEXO

A) DECLARAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“A INFLUÊNCIA DA BIÓPSIA INCISIONAL NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL EM RATOS – INVESTIGAÇÃO DA CITOPATOLOGIA COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO.”** Sob coordenação da **Profª.Drª. Rosilene Calazans Soares** (protocolo **CEPA 33/2013**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 23/10/2013.

São Cristóvão, 24 de outubro de 2013.

Prof. Dr. FLÁVIA TEIXEIRA SILVA
Coordenadora do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606