

CARCINOGENESE EXPERIMENTAL: LESÕES PALATINAS E LINGUAIS PRODUZIDAS PELO ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4NQO) EM RATOS

Cláudia Maria NAVARRO*
Oslei Paes de ALMEIDA**
Sérgio Roberto Peres LINE**

- **RESUMO:** Foi pincelado óxido de nitroquinolina a 0,5% em propinoglicol no palato de 74 ratos Wistar, quatro vezes por semana. Após 1, 2, 3 e 6 meses, os animais foram sacrificados e o palato e a língua observados macro e microscopicamente. Após 2 e 3 meses houve perda de definição das rugosidades e papilas normais, que apresentavam aspecto esbranquiçado e papilomatoso. Microscopicamente, as alterações mais frequentes foram hiperplasia, hiperqueratose e disqueratose focal acantolítica epitelial. Ulcerações caracterizadas como carcinomas bem diferenciados ocorreram no palato de 37,5% e na língua de 58,3% dos animais tratados com 4NQO durante 6 meses. No estômago de 33,3% dos ratos foram observadas ulcerações delimitadas por hiperplasia epitelial. Não foram observadas metástases nos linfonodos cervicais.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Carcinógenos; palato; língua.

Introdução

No Brasil, o carcinoma espinocelular de boca corresponde a 14% das neoplasias malignas, sendo considerado grave problema de saúde pública.^{3,6}

Experimentalmente, o carcinoma de boca foi largamente estudado a partir do modelo estabelecido por Salley,²¹ que utilizou como carcinógeno o hidrocarboneto policíclico lipossolúvel 9,10-dimetil-benzantraceno (DMBA) a 0,5%, aplicado na bolsa da bochecha de hamster, três vezes por semana. Os primeiros carcinomas foram observados após 7 semanas de tratamento. Posteriormente, Fujita et al.⁵ descreveram o desenvolvimento de carcinomas na borda lateral da língua de hamster, usando o mesmo carcinógeno.

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Diagnóstico Oral – Faculdade de Odontologia – UNICAMP – 13414-018 – Piracicaba – SP.

Como o DMBA é pouco efetivo na mucosa de animais de laboratório, como rato e camundongo, Wallenius & Lekholm²⁶ estabeleceram um outro modelo experimental, usando o óxido de nitroquinolina (4NQO). O 4NQO é uma amina aromática hidrossolúvel que, aplicada no palato de rato três vezes por semana a 0,5% em propilenoglicol, provoca carcinomas de palato e língua após 6 meses.¹ Por meio desse modelo verificaram-se efeitos da cirrose hepática, xerostomia e deficiência de ferro no processo de carcinogênese.^{9,10,19}

Provavelmente por ser mais simples e pelas lesões ocorrerem concomitantemente no palato e na língua, esse modelo é um dos mais usados no estudo de carcinogênese bucal.^{2,11,14,17,18} Os dados da literatura mostram que carcinomas desenvolveram-se no palato 6 a 7 meses após a aplicação de 4NQO.^{10,19,26} O objetivo deste trabalho foi descrever os efeitos de 4NQO no palato e na língua de ratos após 1, 2, 3 e 6 meses de aplicação, para observação das alterações durante o desenvolvimento do processo carcinogênico.

Material e método

Foram usados 74 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*) machos, pesando cerca de 200 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos, o controle, composto por 20 ratos, e o experimental, por 54 ratos tratados com óxido de nitroquinolina.

Óxido de nitroquinolina (4NQO) diluído a 0,5% em propilenoglicol foi aplicado no palato de ratos não anestesiados, com auxílio de pincel, quatro vezes por semana durante 1, 2, 3 e 6 meses. Após cada aplicação os animais foram privados de água durante 5 horas, para permitir maior tempo de contato da substância carcinogênica com a mucosa palatina. Nos períodos de 1, 2 e 3 meses, foram usados 10 animais por grupo. O grupo de 6 meses tinha 24 ratos, perfazendo um total de 54. Para cada período foram usados 5 ratos como grupo controle.

Os ratos foram sacrificados por inalação excessiva de éter etílico, e maxilas, língua, linfonodos cervicais e estômago foram fixados em formol a 10%. Após observações macroscópicas com auxílio de lupa estereoscópica, as maxilas foram descalcificadas em ácido tricloroacético a 6% por 4 dias e seccionadas transversalmente em três partes, nas regiões do 1º, 2º e 3º molar. A língua foi dividida longitudinalmente em 4 partes. O estômago foi seccionado longitudinalmente de modo a incluir as áreas macroscopicamente alteradas. Os linfonodos também foram examinados e seccionados transversalmente para inclusão. A inclusão foi feita em parafina, e os cortes de 7 µm foram corados com HE.

Para quantificação macroscópica do palato e da língua, considerou-se apenas a alteração mais severa de cada animal.

Resultados

Os animais de grupo controle não mostraram alterações macro e microscópicas, e os dados a seguir referem-se apenas aos tratados com 4NQO. As alterações de palato e língua ocorreram nas regiões intermolares, que correspondem ao palato duro e às papilas filiformes verdadeiras na língua.

A Tabela 1 mostra as alterações macroscópicas observadas nos períodos de 1 a 6 meses. Após 2 meses, a alteração mais freqüente foi o aspecto esbranquiçado, com perda de definição das rugosidades palatinas ou das papilas linguais. No grupo de 3 meses, 40% e 30% dos animais apresentaram respectivamente o palato e a língua com aspecto papilomatoso, sendo que este aspecto estava presente também após 6 meses (Figuras 1 e 3). Ulcerações ocorreram apenas depois de 6 meses; na maioria eram extensas e, no caso do palato, provocaram mobilidade dentária (Figura 5).

Tabela 1 - Características macroscópicas do palato (P) e da língua (L) de ratos tratados com 4NQO durante 1, 2, 3 e 6 meses

PERÍODO (MESES)	1		2		3		6	
Nº DE ANIMAIS	10		10		10		24	
	P	L	P	L	P	L	P	L
aspecto normal	10(100)	10(100)	7(70)	0	0	0	0	0
mucosa esbranquiçada*	0	0	2(20)	10(100)	6(60)	7(70)	5(20,8)	3(16,5)
aspecto papilomatoso	0	0	1(10)	0	4(40)	3(30)	10(41,6)	7(29)**
ulceração (carcinoma)	0	0	0	0	0	0	9(37,5)	14(58,3)

Obs.: Para cada animal foi considerada apenas a alteração mais acentuada. Os valores entre parênteses representam a porcentagem de animais.

* O aspecto de mucosa esbranquiçada estava associado à perda de definição das rugosidades palatinas e atrofia de papilas linguais.

** Na língua de 3 animais foram encontrados papilomas macroscopicamente evidentes.

Microscopicamente o aspecto esbranquiçado foi caracterizado como áreas de hiperqueratose e eventual papilomatose (Figura 2). Na língua, os papilomas foram mais evidentes e mais facilmente caracterizados (Figura 4). Microscopicamente foram freqüentes as áreas de disqueratose focal acantolítica, com típicas fendas suprabasais e células hialinizadas. Todas as ulcerações correspondiam a carcinomas bem diferenciados, com ou sem envolvimento ósseo ou do tecido muscular (Figura 6).

No estômago de 8 ratos (33,3%), após 6 meses de aplicação de 4NQO, observaram-se alterações circulares com aproximadamente 4 mm de diâmetro, de bordas

elevadas e esbranquiçadas, e porção central deprimida. Microscopicamente correspondiam a ulcerações com discreto infiltrado inflamatório, epitélio adjacente hiperplásico e intensamente hiperqueratinizado, sem características de malignidade.

Não foram observadas células metastáticas nos linfonodos examinados. Os linfonodos de ratos com ulcerações de língua mostraram espaços vasculares aumentados e áreas de hiperplasia.

Discussão

Ratos Sprague Dawley são os mais usados para o estudo de carcinogênese com 4NQO, entretanto, no nosso meio, os ratos Wistar são os mais comuns. Apenas dois autores^{16,2} usaram ratos Wistar na carcinogênese com 4NQO. Observações preliminares em nosso laboratório, aplicando 4NQO três vezes por semana, mostraram o desenvolvimento de carcinomas após 6 meses, mas em grau considerado menor do que o descrito na literatura. Em vista disso, neste trabalho foram feitas quatro aplicações semanais, e a quantidade e a gravidade dos carcinomas aumentaram consideravelmente. Não se pode, entretanto, deduzir que os ratos Wistar são mais resistentes que o Sprague Dawley ao 4NQO, visto que outros fatores também teriam que ser considerados, particularmente a quantidade aplicada em cada sessão.

Macro e microscopicamente observou-se o envolvimento freqüente da margem gengival, o que indica ser esta área mais susceptível à ação do 4NQO. Isso pode estar associado à maior permeabilidade e ao alto *turnover* das células do epitélio juncional. Comprometimento gengival com formação de bolsa periodontal foi descrito por vários autores.^{10,19,20,29}

Na língua, as lesões ocorreram principalmente na região do tubérculo intermolar, uma vez que existe intenso contato fisiológico entre o tubérculo e a região intermolar do palato.^{7,8,19} Lesões de língua ocorreram em todos os trabalhos que usaram este modelo animal, o que torna evidente sua utilidade para o estudo da carcinogênese de dorso de língua, que, entretanto, não é freqüente no homem.

As principais alterações do palato e da língua foram acantose, hiperqueratose e disqueratose focal acantolítica, que evoluem eventualmente para papilomas. Na maioria dos estudos de carcinogênese, e também neste, manifestações macroscópicas iniciais de caráter exofítico foram freqüentes.^{4,12,15,24,28,29} Talvez devido à inadequada vascularização, as lesões papilomatosas sofrem necrose, formando pequenas ulcerações de bordas elevadas. Devido à proliferação epitelial, as ulcerações apresentam superfície vegetante, com projeções digitiformes. Essa seqüência de alterações está de acordo com a descrição de vários autores.^{10,20,23,25,28,27} Conseqüentemente, o modelo experimental descrito por Wallenius & Lekholm²⁶ é útil não apenas para o estudo de carcinomas do palato e da língua do rato, como também de hiperplasias, hiperqueratose e papilomas. Áreas de disqueratose focal acantolítica (DFA) de palato e língua

não puderam ser caracterizadas macroscopicamente.¹⁶ Microscopicamente as lesões de disqueratose focal acantolítica estavam presentes em áreas de hiperqueratose, papilomatoses ou de carcinomas invasivos. A importância da DFA no desenvolvimento de carcinomas ainda é controversa.^{16,20,29}

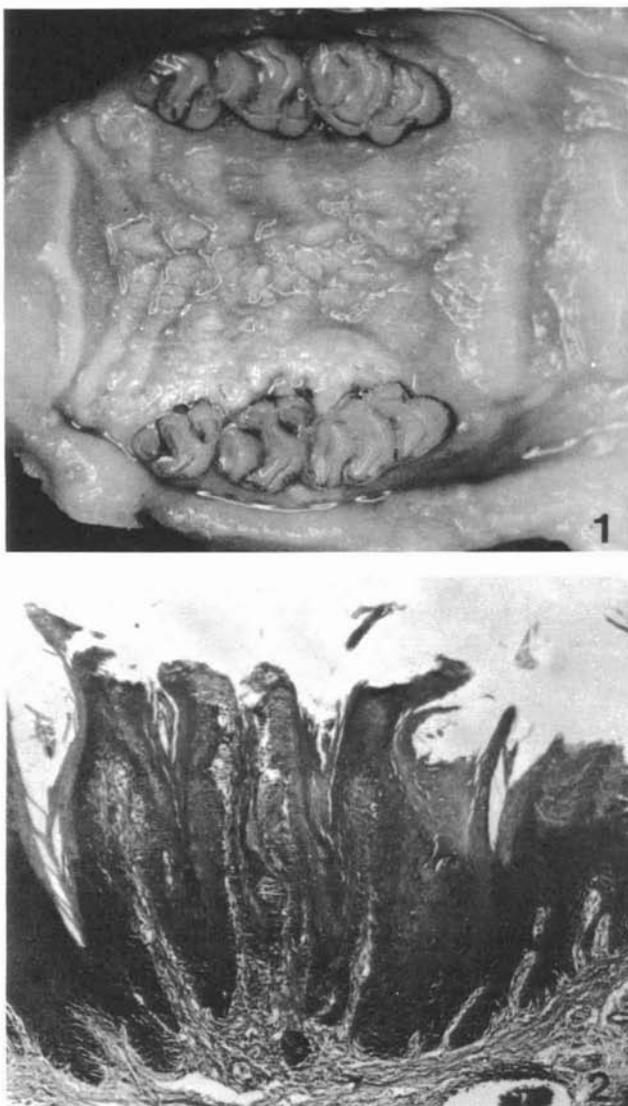


FIGURA 1 – Mucosa do palato de rato, 3 meses após aplicação de 4NQO. A gengiva palatina do lado esquerdo e a porção central do palato têm aspecto papilomatoso (6,5X).

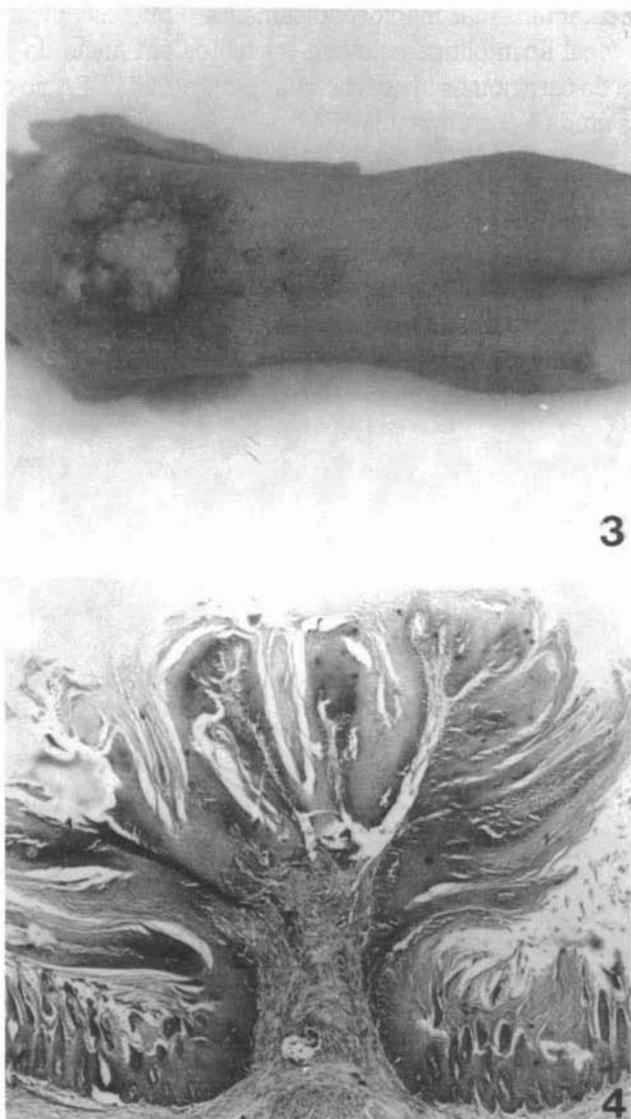


FIGURA 2 - Aspecto microscópico da mucosa palatina de rato, após 3 meses de aplicação de 4NQO. Observa-se hiperplasia papilomatosa formada de epitélio hiperqueratinizado e conjuntivo infiltrado por poucas células inflamatórias (H & E, 75X).

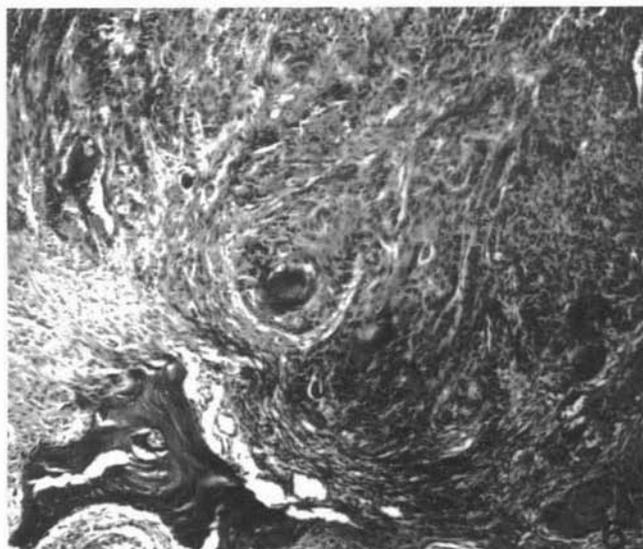


FIGURA 3 – Língua de rato, após 6 meses de aplicação de 4NQO. No tubérculo intermolar observa-se papiloma bem desenvolvido (6,5X).

FIGURA 4 – Dorso de língua de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO. Papiloma benigno com projeções digitiformes e suporte de tecido conjuntivo (H & E, 30X).

FIGURA 5 – Mucosa do palato de rato, após 6 meses de aplicação de 4NQO. Extensa ulceração deformante provocou exposição da raiz do 2º molar e deslocamento do 3º molar (6,5X).

FIGURA 6 – Aspecto microscópico da mucosa palatina de rato após 6 meses de aplicação de 4NQO. Há intensa proliferação de células neoplásicas e algumas pérolas córneas, além de fragmentos de tecido ósseo (H & E, 90X).

Embora descrito por outros autores,^{23,25,26} não se observaram carcinomas no estômago dos ratos tratados com 4NQO. Ulcerações com bordas elevadas ocorreram em 33,3% dos animais, mas de natureza degenerativa e/ou inflamatória. Também não foram observadas metástases em linfonodos cervicais em outros trabalhos.^{19,23} Metástases em carcinogênese bucal experimental são consideradas raras, tanto com o DMBA como com o 4NQO. Wallenius,²⁵ usando DMBA, observou que de 28 ratos, apenas 1 exibiu metástase. Shingaki et al.²² observaram metástase em 26,1% dos hamsters tratados com DMBA, mas esses animais apresentavam imunodepressão causada por cortisona.

Conclusão

Carcinomas causados por 4NQO aplicado no palato de ratos foram precedidos por acantose, papilomas, hiperqueratose e disqueratose focal acantolítica. O modelo empregado mostrou-se adequado para o estudo simultâneo da carcinogênese de palato e língua, sendo a metodologia utilizada relativamente simples, permitindo a avaliação dos fatores envolvidos no processo. Não foram observadas metástases.

NAVARRO, C. M., ALMEIDA, O. P. LINE, S. R. P. Experimental carcinogenesis: lesions of the palate and tongue provoked by nitroquinoline oxide (4NQO) in rates. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-80, 1994.

■ **ABSTRACT:** *The palate of 74 Wistar rats were painted with 0,5% 4-nitroquinoline-1-oxide, 4 times weekly. After 1, 2, 3 and 6 months the animais were killed and the palate and tongue observed macro and microscopically. After 2 and 3 months the tongue and palate were whitish and papillomatous. Microscopically hyperplasia, hyperkeratosis and focal acantholytic dyskeratosis were found. Ulcerations characterized as well differentiated carcinomas occurred on the palate of 37,5% and on the tongue of 58,3% of the animals treated with 4NQO for 6 months. The stomach of 33,3% of rat treated with 4NQO showed ulcers surrounded by epithelial hyperplasia. Metastasis were not detected in the cervical lymph nodes.*

■ **KEYWORDS:** *Carcinogens; palate; tongue.*

Referências bibliográficas

1. EVESON, J. W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 10, p. 129-46, 1981.

2. FISHER, A. V. Experimental oral carcinogenesis: a basic model for the study of oral carcinogenesis using the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Dan. Med. Bull.*, v. 37, p. 433-43, 1990.
3. FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int. J. Cancer*, v. 43, p. 992-1000, 1989.
4. FREEDMAN, A., SHKLAR, G. Alcohol and hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 46, p. 794-805, 1978.
5. FUJITA, K., et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *J. Dent. Res.*, v. 52, p. 327-30, 1973.
6. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. *Registro nacional de patologia tumoral: diagnóstico de câncer*. Brasil. 1981-1985. Rio de Janeiro, 1991. p. 212.
7. KUTUZOV, H., SICHER, H. The filiform and the conical papillae of the tongue in the white rat. *Anat. Rec.*, v. 110, p. 275-88, 1951.
8. _____. Anatomy and function of the palate in the white rat. *Anat. Rec.*, v. 114, p. 67-84, 1952.
9. LEKHOLM, U., WALLENIUS, K. Experimental oral cancer in rats with xerostomia. *Odontol. Revy*, v. 27, p. 11-8, 1976.
10. _____. Effects of essential fatty acid deficiency and of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis on oral carcinogenesis in the rat. *Odontol. Revy*, v. 27, p. 165-80, 1976.
11. LUKER, J., et al. The effect of 3T3 fibroblasts on the expression of anchorage independence and cornification of oral keratinocytes. *Virchows. Arch. [B]*, v. 57, p. 19-26, 1989.
12. MAREFAT, M. P., ALBRIGHT, J. T., SHKLAR, G. Ultrastructural alterations in experimental lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 47, p. 334-42, 1979.
13. MATTHEWS, J. B. et al. *In situ* characterisation of the oral mucosal inflammatory cell response of rats induced by 4-nitroquinoline-N-oxide. *Carcinogenesis*, v. 7, p. 783-8, 1986.
14. _____. The relationship between epithelial Ia expression and inflammatory cell infiltrate during experimental oral carcinogenesis. *Virchows. Arch. [A]*, v. 413, p. 521-8, 1988.
15. ODUKOYA, O., SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 58, p. 315-20, 1984.
16. PHILIPSEN, H. P., FISHER, A. V. Focal acantholytic dyskeratosis in experimental oral carcinogenesis in rats. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 12, p. 30-6, 1983.
17. PITIGALA-ARACHCHI, A. et al. Ia⁺ epithelial dendritic cells during oral carcinogenesis in the rat. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 17, p. 138-44, 1988.
18. _____. Epithelial dendritic cells and connective tissue macrophages in oral carcinogenesis and the effects of systemic *Corynebacterium parvum*. *Carcinogenesis*, v. 10, p. 501-7, 1989.
19. PRIME, S. S., MACDONALD, D. G., RENNIE, J. S. The effect of iron deficiency on experimental oral carcinogenesis in the rats. *Br. J. Cancer*, v. 47, p. 413-8, 1983.
20. PRIME, S. S. et al. Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline-N-oxide. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 15, p. 280-3, 1986.
21. SALLEY, J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.*, v. 33, p. 253-62, 1954.

22. SHINGAKI, S., OTAKE, K., NAKAJIMA, T. Regional lymph node metastasis in carcinoma of the hamster tongue. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 64, p. 190-6, 1987.
23. STEIDLER, N. E., READE, P. C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 57, p. 524-31, 1984.
24. STORMBY, N. G., WALLENUS, K. Effect of reduced salivation on oral tumour induction in hamsters by 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Odontol. Revy*, v. 15, p. 186-209, 1964.
25. WALLENUS, K. Experimental oral cancer in the rat with special reference to the influence of saliva. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, suppl. 180, 1966.
26. WALLENUS, K., LEKHOLM, U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Odont. Revy*, v. 24, p. 39-48, 1973.
27. WALLENUS, K., AHLSTROM, U., HEYDEN, G. Cytogenetic and histochemical analysis of experimental oral carcinogenesis in the rat. *Odont. Revy*, v. 26, p. 309-26, 1975.
28. WHITE, F. H., GOHARI, K., SMITH, C. J. Histological and ultrastructural morphology of 7, 12 - dimethylbenzanthracene carcinogenesis in hamster cheek pouch epithelium. *Diagn. Histopathol.*, v. 4, p. 307-33, 1981.
29. WONG, P. N. C., WILSON, D. F. 4-nitroquinoline-1-oxide induced carcinogenesis in rat palate. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 12, p. 375-84, 1983.

Recebido em 24.5.1993.