

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

Linha de Pesquisa

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

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO AGENTE 4-
NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO) SOBRE A
PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA E
ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR**

Autor:

MARCELO EKMAN RIBAS

Orientador: **Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing**

Porto Alegre

2013

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO AGENTE 4- NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO)
SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA E ESPONTÂNEA EM RATOS
WISTAR**

MARCELO EKMAN RIBAS

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

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Ekman Ribas, Marcelo
EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO AGENTE 4-NITROQUINOLINA 1-
ÓXIDO (4NQO) SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA E
ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR / Marcelo Ekman Ribas. --
2013.
52 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.

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

1. Câncer Oral. 2. Doença Periodontal. 3.
Metabolismo Ósseo. 4. Inflamação. 5. Ratos. I.
Kuchenbecker Rösing, Cassiano, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

“A vida é um processo fluente e em alguns lugares do caminho coisas desagradáveis ocorrerão. Podem deixar cicatrizes, mas a vida continua a fluir. É como a água fluente, que ao estagnar-se, torna-se podre; não pare! Continue bravamente, porque cada experiência nos ensina uma lição.”

Bruce Lee

Dedico este trabalho à minha família, principalmente à minha mãe **Cary** por acreditar sempre e pelo apoio incondicional em todos os momentos, sendo um verdadeiro exemplo de perseverança e dedicação, abdicando de tudo por mim e por meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, do fundo do coração, às pessoas que participaram de maneira decisiva para que eu alcançasse mais este objetivo na vida. Sempre com dedicação, interesse, fraternidade, irmandade e solidariedade. Muito obrigado a todos.

Agradeço a **Deus** pela força de poder seguir em frente, lutar e perseverar ao longo de toda minha vida.

Ao meu pai **Luiz Carlos**, que, mesmo não podendo estar em convívio diário, sempre me apoiou e estendeu seu abraço fraterno em todos os momentos de dificuldade.

Aos meus irmãos **Eduardo** e **Gustavo**, pelo convívio e apoio, sempre acreditando em mim em todos os momentos.

À minha namorada **Bárbara**, por sempre estar presente junto a mim, em todos os momentos, sempre me apoiando e sendo um porto seguro.

Ao meu padrasto **Eduardo**, pelo convívio e pelos ensinamentos de sempre manter a humildade e força frente aos obstáculos.

Ao meu padrinho/tio/collega de profissão **Ivan**, pelo convívio diário, apoio incondicional desde o início da minha vida e da minha carreira profissional, sempre sendo uma referência em todos os aspectos para a minha vida. À minha madrinha **Helene**, pela presença em minha vida, carinho e convívio, profissional e familiar.

À minha avó **Cely**, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, me ajudar a chegar até aqui sempre presente. Agradeço por ter sempre uma palavra de conforto nos momentos de angústia.

Ao meu amigo **Rogério**, por ser como um irmão em minha vida.

Aos meus colegas/amigos/irmãos **Tobias** e **Harry**, e seus familiares, pela força, carinho, amizade e dedicação construídos ao longo deste período.

Ao professor **Marcelo** Lamers pelos ensinamentos, convívio pessoal e apoio, para que este trabalho fosse possível.

Ao meu colega e amigo **Fernando** Martins por fazer parte do meu crescimento profissional e estar presente como amigo, convivendo dia a dia de trabalho.

Aos colegas/professores **Juliano** Cavagni e Eduardo Gaio (**Duda**), pelo auxílio no mestrado, sempre presentes dividindo momentos bons e estendendo a mão frente às dificuldades.

Aos bolsistas de iniciação científica da periodontia **Vagner** e **Andressa**, por estarem presentes dividindo as dificuldades e momentos excelentes ao longo deste período.

Aos colegas **Grasieli** e **Alessandro** que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Aos meus colegas de mestrado, e aos colegas de doutorado, por dividirem experiências, convívio, momentos bons e dificuldades, sempre sendo exemplo de força para continuar.

Aos professores, funcionários e colegas da Periodontia da UFRGS, pelos momentos inesquecíveis que passei e que passarei ao longo da minha vida.

E a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse alcançar mais este objetivo de vida, nunca esquecerei, muito obrigado a todos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Cassiano Kuchenbecker Rösing**, por todo apoio e conhecimento que, brilhantemente, transmitiu, durante todo esse período de convivência.

Obrigado pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação.

Obrigado por acreditar em uma proposta de trabalho diferente.

A tua confiança e sabedoria foram os estímulos que me permitiram vencer as inseguranças deste processo.

Agradeço por ter ido além da orientação e, como conselheiro, contribuiu para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

O corpo de evidências científicas a respeito da inter-relação entre câncer oral e doenças periodontais vem aumentando consideravelmente. Entretanto, estudos avaliando os mecanismos biológicos que permeiam esta associação ainda são escassos. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da exposição ao carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), sobre a perda óssea alveolar induzida por ligadura e espontânea em ratos Wistar. Foram utilizados 84 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos experimentais: Grupo 1 (Controle total); Grupo 2 (Exposição ao 4NQO); Grupo 3 (Perda óssea alveolar); Grupo 4 (Exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar). Os grupos 2 e 4 foram expostos ao carcinógeno, diluído em água (50ppm), por vinte semanas. A perda óssea alveolar foi induzida, por meio de ligadura com fio de seda no segundo molar da hemiarcada direita dos animais, nos grupos 3 e 4, sendo no grupo 4, após a exposição ao 4NQO. O peso corporal dos animais foi monitorado ao longo do estudo. Após decorridas vinte semanas do período experimental, os animais foram mortos e as peças maxilares e línguas foram analisadas em relação à perda óssea alveolar e lesões macroscópicas linguais. 71 animais completaram o estudo. Todos os animais expostos ao 4NQO apresentaram lesões macroscópicas na língua, demonstrando que o modelo experimental de exposição ao carcinógeno foi efetivo. A análise da perda óssea alveolar demonstrou diferenças significativas entre grupos expostos em relação a não expostos ao 4NQO na ocorrência de perda óssea alveolar espontânea. Essas diferenças não foram observadas nos lados com ligadura. Pode-se concluir que a exposição ao carcinógeno 4NQO potencialmente influencia a perda óssea alveolar espontânea em ratos.

Palavras Chave: Câncer oral, doença periodontal, metabolismo ósseo, inflamação, ratos.

ABSTRACT

Scientific evidence about the inter-relationship between periodontal disease and oral cancer has increased considerably. However, studies evaluating the biological mechanisms related to this association are still scarce. The aim of this study was to evaluate the effect of exposure to 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) on spontaneous and ligature-induced alveolar bone loss. For this, 84 male Wistar rats were divided into four groups: Group 1 (Full Control), Group 2 (4NQO exposure), Group 3 (Alveolar bone loss), Group 4 (4NQO exposure and alveolar bone loss). Groups 2 and 4 were exposed to the carcinogen, diluted in water (50ppm) for twenty weeks. Alveolar bone loss was induced by silk ligatures at the upper right maxillae, around the second molar, for animals in groups 3 and 4; in group 4, ligatures were placed after exposure to 4NQO. Body weight of the animals was monitored throughout the study. After twenty weeks of the experimental period, the animals were killed and the maxillae and tongues were analyzed. Morphometric analysis of alveolar bone loss and macroscopic lesions in tongue were analyzed in 71 animals which completed the study. All animals exposed to 4NQO presented macroscopic lesions in dorsal part of tongue, demonstrating that the experimental model of carcinogen exposure was effective. The analysis of alveolar bone loss, was performed by medians and interquartile ranges and showed significant differences between animals exposed or not to 4NQO in terms of spontaneous alveolar bone loss. This was not observed in sites with ligatures. It can be concluded that exposure to carcinogenic 4NQO potentially influences spontaneous alveolar bone loss in rats.

Key Words: Oral cancer, periodontal disease, bone metabolism, inflammation, rats.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	9
ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	10
1. Considerações sobre Câncer Oral	10
1.1. Perfil Inflamatório das Lesões de Câncer	11
1.2. Papel do Carcinoma sobre o Metabolismo Ósseo	11
2. Doenças Periodontais	13
3. Inter-relação entre Câncer e Doenças Periodontais	14
4. Métodos Experimentais Animais de Indução de Doença Periodontal e Carcinoma Oral	19
OBJETIVOS	21
1. Objetivo Geral	21
2. Objetivos Específicos	21
ARTIGO CIENTÍFICO	22
RESUMO	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Características e Distribuição das Amostras	25
2.2. Exposição ao Carcinógeno	27
2.3. Indução de Doença Periodontal	28
2.4. Morte dos Animais e Obtenção das Peças Maxilares	28
2.5. Análise Morfométrica da Progressão de Perda Óssea	29
2.6. Análise Macroscópica das Línguas	29
2.7. Análise Estatística	31
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO	50
ANEXO B – ANÁLISE QUALITATIVA DOS ACHADOS MACROSCÓPICOS DAS LÍNGUAS ANALISADAS	51

APRESENTAÇÃO

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

Esta dissertação de mestrado está estruturada da seguinte maneira:

- a) Antecedentes e justificativa, enfatizando os principais pontos de discussão.
- b) Artigo científico: **“EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO 4- NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO(4NQO) SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA E ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR”**. O presente estudo será traduzido para o idioma inglês e submetido para publicação no periódico *Journal of Periodontal Research* (fator de impacto 1.99, *journal citation report*, 2013).

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1. Considerações sobre Câncer Oral

Dados do relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (World Cancer Report 2008) demonstram que o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O câncer oral é considerado um importante problema de saúde pública, representando a sexta neoplasia maligna mais comum. A estimativa anual foi de 275.000 novos casos em 2008, passando para cerca de 400.000 novos casos diagnosticados em 2013, sendo dois terços desses ocorrendo em países desenvolvidos (HERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2013; KRÜGER et al., 2013).

A incidência de carcinomas de cabeça e pescoço varia em relação às diferentes regiões do mundo. Na América do Norte e Reino Unido, este tipo de câncer representa cerca de 3-4% da incidência de todos os tipos de neoplasias diagnosticadas anualmente. No sul da Ásia e na África, essa estimativa dobra em relação aos Estados Unidos e Reino Unido, sendo a incidência de 8-10% dentre todas as formas de câncer (FRONIE et al., 2013). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 2013, no ano de 2012, ocorreram 14.170 novos casos de câncer oral, sendo 9990 homens e 4180 mulheres, o que ocupa a sétima colocação em termos de incidência dentre todos os tipos de câncer.

O carcinoma epidermóide oral é o tipo mais comum, correspondendo, no Brasil e no Reino Unido, a cerca de 90% a 95% dos cânceres orais (BRENER, BARBOSA, GRANDINETTI, 2007). A ocorrência de casos de câncer oral, principalmente os de origem lingual, vem crescendo inclusive dentro de populações mais jovens (MARUR, FORASTIERE, 2008; VERED, DAYAN, 2013; MONSJOU et al., 2013). Estudos demonstram que a língua é o sítio mais comum de desenvolvimento do carcinoma epidermóide, compreendendo cerca de 41% dos casos (KOROSTOFF et al., 2011). No país, a localização que mais comumente está relacionada ao carcinoma bucal é a língua, seguido pelo assoalho bucal e o lábio inferior. O número elevado de casos de câncer oral e sua mortalidade estão relacionados consideravelmente a uma pré-disposição individual relacionada a características genéticas específicas e à exposição a carcinógenos como tabaco, consumo de álcool, deficiência de micronutrientes (PETTI, 2009). O câncer oral apresenta um grande impacto sobre a qualidade de vida devido, muitas vezes, a perda

funcional derivada das modalidades de tratamento, mesmo com os melhores cuidados disponíveis atualmente (SHENOI et al., 2012).

1.1. Perfil Inflamatório das Lesões de Câncer

A correlação entre câncer e inflamação foi primeiramente estudada no século 19, com bases observacionais do desenvolvimento de tumores em regiões com perfil inflamatório crônico e de presença de células inflamatórias em biópsias de lesões de câncer. Os mediadores e os efetivos celulares inflamatórios são importantes constituintes do ambiente local tumoral. Em alguns tipos de câncer, as condições inflamatórias estão presentes principalmente antes das transformações malignas ocorrerem (MANTOVANI, ALLAVENA, BALKWILL, 2008). As lesões de câncer encontram-se, com frequência, envoltas em um microambiente rico em citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas. Estes fatores são produzidos pelo próprio tumor e pelo tecido circundante, contribuindo para o desenvolvimento e progressão maligna (GASCHE et al., 2011).

Estudos prévios em células humanas *in vitro* e em carcinomas orais epidermóides demonstraram que a concentração de certos mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, principalmente do tipo IL-1, IL-6 e IL-8, metaloproteinases e fator de crescimento vascular endotelial estavam aumentadas. Existem evidências de que essas citocinas são produzidas de uma forma desequilibrada em lesões tumorais, e apresentam um papel importante no crescimento celular, invasão, interrupção da supressão tumoral e sobrevivência (SAHEBJAMEE et al., 2008; AGGARWAL, GEHLOT, 2009; KOROSTOFF et al., 2011). As evidências demonstram que os tumores orais, principalmente linguais, apresentam um padrão de crescimento e invasão com características de disseminação importantes, e uma intensa resposta inflamatória na interface tumoral (LUNDQVIST et al., 2012).

1.2. Papel do Carcinoma sobre o Metabolismo Ósseo

O carcinoma oral do tipo epidermóide apresenta característica de invasão de tecido ósseo dos maxilares (JIMI et al. 2011; HWANG et al. 2012). A prevalência de envolvimento ósseo mandibular varia de 12-56% dos casos, sendo o tratamento e reabilitação destes casos particularmente desafiadores. Até o momento, os mecanismos celulares e moleculares dessa invasão óssea por parte do carcinoma, e os meios para evitar

isso, permanecem amplamente desconhecidos (QUAN et al., 2012). A reabsorção óssea pelas células osteoclásticas é um importante passo para a invasão do osso nos tumores malignos orais. As células do câncer possuem a capacidade de produzir mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α , IL-23. Esses mediadores são capazes de estimular não só o crescimento e desenvolvimento tumoral, mas também a diferenciação de células hematopoiéticas em osteoclastos ativos para reabsorção e invasão óssea (OKAMOTO et al., 2000; SAHEBJAMEE et al., 2008; FUKUDA et al., 2010; GASCHÉ et al., 2011). A Figura 1 demonstra o mecanismos pelos quais há a possível relação entre aspectos do processo inflamatório e o desenvolvimento de neoplasias que invadem o tecido ósseo.

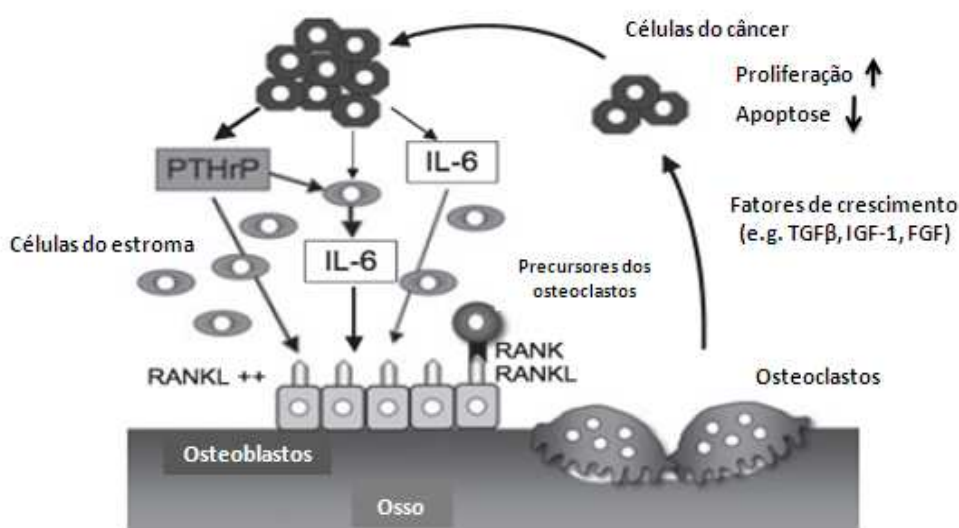


Figura 1 – Representação esquemática do papel da IL-6 e PTHrP induzidos pelo carcinoma oral, na formação e diferenciação dos osteoclastos. O osso armazena diversos fatores de crescimento incluindo fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento transformador β . IL-6 e PTHrP produzidos pelas células do carcinoma oral e IL-6 produzida pelas células do estroma, induzem os osteoblastos e fibroblastos a sintetizar RANKL e subsequente formação dos osteoclastos. Esses fatores de crescimento são liberados da matriz óssea em consequência da reabsorção osteoclástica, estimulando a proliferação das células do câncer e inibindo a apoptose. IL-6: interleucina 6; PTHrP: proteína relacionada ao hormônio da paratireóide; RANKL: receptor ativador do fator nuclear kapa B. Adaptado de: JIMI, E., et al. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*. v. 17, p. 462-468, 2011.

O osso reabsorvido pelos osteoclastos provém espaço e nutrientes para o desenvolvimento para as células do câncer (DEYAMA et al., 2008). Uma vez que as células invadem o tecido ósseo, elas proliferam com maior facilidade e inibem sua apoptose devido à matriz óssea ser uma fonte de variadas citocinas e fatores de crescimento. A matriz óssea também é capaz prover um ambiente extremamente fértil para crescimento e desenvolvimento celular (JIMI et al., 2011). Apesar dos trabalhos demonstrarem que as Interleucinas liberadas durante o processo metastático do carcinoma

induzem reabsorção óssea, é possível que esta alteração do perfil de citocinas também influencie o processo de remodelação e metabolismo ósseo.

2. Doenças Periodontais

As doenças periodontais são consideradas patologias de caráter infecto-inflamatório destrutivo dos tecidos moles e duros que circundam os dentes (PAGE, KORNMAN, 1997; LIU et al., 2009). Essas doenças ocorrem quando um desafio microbiano é gerado, determinando um desequilíbrio no processo entre saúde-doença, onde a resposta imunológica/inflamatória do hospedeiro é superposta (LIU et al., 2010). A doença periodontal se caracteriza por ser uma infecção de caráter crônico que resulta em inflamação dos tecidos da margem gengival (gengivite), sendo que se não for removido o fator etiológico pode haver progressão para destruição gradual dos tecidos de sustentação dos dentes (periodontite) (IRFAN, DAWSON, BISSADA, 2001; MICHAUD et al., 2007). O nível de destruição dos tecidos é afetado pela magnitude e pelas características da resposta de cada indivíduo, podendo ser modulado por fatores sistêmicos, do ambiente, genéticos, fumo e diabetes (TAYLOR et al., 1998; BERGSTROM et al., 2000; GEURS et al., 2003; EBERSOLE et al., 2008).

Estima-se que exista uma prevalência de até 15% da população global portadora de doença periodontal avançada e cerca de 90% pode estar afetada de alguma forma com doença periodontal leve, sendo uma das patologias infecciosas mais prevalentes do mundo (IRFAN, DAWSON, BISSADA, 2001 & PIHLSTROM, MICHALOWICZ, JOHNSON, 2005). Desde a década de 80, a inter-relação entre as infecções de origem bucal, principalmente as doenças periodontais, e outras patologias sistêmicas, tem sido estudada. Um dos primeiros estudos que demonstrou essa associação observou que, pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio, revelaram piores condições de saúde oral do que pacientes de mesma idade e sexo que não apresentavam doenças cardiovasculares (MATTILA et al., 1989). Nos últimos anos, as evidências científicas demonstram uma inter-relação entre as doenças periodontais e efeitos adversos sistêmicos importantes como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, parto prematuro e baixo peso neonatal, obesidade, osteoporose, diabetes, lesões musculares, Alzheimer e câncer (SCANNAPIECO, 2005; PIHLSTROM, MICHALOWICZ, JOHNSON, 2005; de SOUZA et al., 2012; GONDIVKAR et al., 2013; SHAIK et al., 2013). Estas associações apresentam embasamento principalmente relacionado à influência dos patógenos

periodontais, e também do caráter pró-inflamatório dessas patologias e de outras condições sistêmicas.

3. Inter-relação entre Câncer e Doenças Periodontais

Considerando a morbidade e mortalidade das lesões de câncer, é extremamente importante a busca do estudo e entendimento de patologias e condições sistêmicas que possam interferir na patogênese dessas doenças. Diversos estudos, nos últimos anos, buscaram elucidar a associação entre doenças periodontais e câncer. Já existem evidências na literatura que suportam uma associação entre essas patologias (TEZAL et al., 2009; FITZPATRICK, KATZ, 2010). A maioria dos estudos que investigam essa relação é do tipo coorte e caso-controle, principalmente conduzidos em populações dos Estados Unidos e Europa (quadro 1). Em relação à análise dos dados, a grande maioria dos estudos contempla estratificações e ajustes para os principais fatores de confusão para ambas as patologias, como consumos de álcool e tabaco. A análise dos parâmetros periodontais é amplamente variada, com boa parte dos estudos focada em perda dentária e análise de perda óssea alveolar radiográfica como principais critérios de avaliação periodontal. Com relação aos parâmetros de avaliação de câncer oral, os dados utilizados foram, em sua maioria, de diagnóstico hospitalar.

Em uma das recentes revisões da literatura realizada por Fitzpatrick e Katz (2010), foi verificada a relação entre a doença periodontal com variados tipos de cânceres. Os autores chegaram à conclusão de que os riscos de se ter câncer são mais consistentes quando se associam os cânceres oral e esofágico com as patologias periodontais. Este estudo demonstrou que a doença periodontal aumenta as chances de se ter câncer oral em homens, independente se fumante ou não, idade, etnia e número de dentes com uma razão de chances (odds ratio) variando de 1.5 a 8. Apesar da utilização de delineamentos semelhantes, alguns autores não encontraram correlação entre doença periodontal e câncer oral (HUJOEL et al., 2003; MICHAUD et al., 2008). Em estudo realizado por Tezal e colaboradores (2007), conduzido em pacientes com câncer lingual, foi demonstrado 5.23 mais chances de desenvolvimento de câncer lingual para cada milímetro de perda óssea alveolar, mesmo após ajuste para idade, fumo e número de dentes. Outro estudo do mesmo grupo encontrou aumento significativo de tumores orais e lesões pré-cancerosas em pacientes com mais de 1.5mm de perda de inserção clínica (TEZAL et al., 2009).

Dentre as razões para a variabilidade dos resultados, podem-se destacar o fato da utilização de diferentes classificações para as doenças periodontais utilizadas nos estudos. Contudo, sob uma visão ampliada, podem-se observar resultados que corroboram a idéia de que indivíduos com doenças periodontais, principalmente em nível mais avançado, apresentam maiores chances de desenvolvimento e progressão de lesões malignas orais. Sempre importante ressaltar que se observa uma carência de estudos experimentais, por limitações metodológicas para a realização dos mesmos, levando em conta a gravidade e mortalidade das patologias malignas envolvidas.

Quadro 1 - Estudos Relacionando Doença Periodontal e Câncer Oral

Autor Ano País	População	Tipo de Estudo	Diagnóstico de Câncer Oral	Critério para Doença Periodontal	Principais Achados	Ajuste para Fatores
Hujoel et al. 2003 EUA	11328 adultos 25-74 anos	Epidemiológico longitudinal	Mortalidade de câncer	Russel Index	Aumento significativo de risco para câncer pulmonar (OR 1,48), sem aumento significativo de risco para outros tipos de câncer, incluindo câncer oral.	Fatores de risco para câncer pulmonar; Gênero; Idade.
Ahn et al. 2012 EUA	7852 A partir de 17 anos	Coorte	Mortalidade de câncer orodigestivo	Perda de inserção clínica; Profundidade de sondagem; Níveis séricos de IgG para P.gingivalis	Periodontite (moderada e severa) foi associada à mortalidade de câncer orodigestivo (OR 2,28), e o índice de mortalidade aumentou com o aumento da severidade da periodontite. Mortalidade de câncer orodigestivo foi relacionada com periodontite e a P. gingivalis independente da presença de doença periodontal.	Sexo, idade, fumo, educação, raça, índice de massa corporal.
Marshall et al. 1992 EUA	290 pacientes	Caso-controle	Diagnóstico de câncer em registros patológicos	Perda dentária	Aumento significativo de câncer oral (OR 2,7) com perdas de 11 ou mais dentes.	Consumo de álcool e fumo.
Meisel et al. 2012 Alemanha	4233 pacientes	Caso-controle	Exame clínico oral para lesões orais e leucoplasias	Profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, índice de placa, sangramento à sondagem e perda dentária	Aumento da severidade de periodontite aumentou probabilidade de desenvolver leucoplasias (OR ajustado para nível socioeconômico e fumo para o segundo, terceiro e quarto quartil da perda de inserção clínica 1,7; 3,3 e 5,3 respectivamente); OR para sangramento à sondagem 2,0; 2,9 e 3,8 respectivamente.	Fatores socioeconômicos, fumo, higiene oral.
Tezal et al. 2009 EUA	473 pacientes	Caso-controle	Pacientes diagnosticados no Rosswel Park Center Institute (1999-2005)	Perda óssea alveolar analisada em radiografias panorâmicas	Cada milímetro de perda óssea alveolar associado com aumento de risco de câncer de cabeça e pescoço (OR 4,36), sendo o poder de associação maior para a cavidade oral, mesmo ajustado para uso de tabaco e álcool. Pacientes com periodontite apresentavam menor diferenciação de lesões ulceradas de câncer. A periodontite crônica é um fator de risco independente para câncer de cabeça e pescoço e o fumo modifica essa associação.	Idade. Gênero, raça/etnia, estado civil, fumo, uso de álcool e perda dentária.
Talamini et al. 2000 Itália	280 pacientes	Caso-controle	Casos de câncer oral e de orofaringe em 3 hospitais do nordeste da Itália	Perda óssea alveolar	Não houve aumento significativo de risco de câncer oral relacionado à perda de 16 ou mais dentes, contudo, condição precária oral foi associada (OR 4,5), mesmo após ajuste para álcool e fumo.	Álcool e fumo
Michaud et al. 2008 EUA	48328 pacientes	Coorte	Casos de câncer orofaríngeo diagnosticados prospectivamente nos EUA (1986-2004)	Pacientes reportaram história de doença periodontal (validadas por aferição de perda óssea radiográfica) e perda dentária.	Não houve aumento significativo de risco de câncer orofaríngeo relacionado ao histórico de doença periodontal ou perda dentária.	Idade, tempo, etnia, índice de massa corporal, atividade física, fumo, histórico de diabetes, região geográfica, altura, álcool, escore de vitamina D e consumo de cálcio, vegetais, carne vermelha, frutas e calorias totais.

Bundgaard et al. 1995 Dinamarca	161 pacientes com CCE oral 400 pacientes controle	Caso-controle	Câncer em mucosa jugal, gengiva, palato duro, língua, região retromolar e assoalho de boca	Perda dentária	Aumento significativo o risco de câncer em pacientes com menos de 15 dentes quando ajustado para tabaco e álcool (OR 2,4).	Fumo,Álcool, Condições dentárias, Estado civil,Residência
Tezal et al. 2007 EUA	51 pacientes com CCE de língua 54 pacientes controle	Caso-controle	Câncer em língua	Perda óssea alveolar através de radiografias panorâmicas (em mm) após ajuste para fumo, número de dentes e idade	Aumento significativo do risco de câncer de língua para cada milímetro de perda óssea alveolar (OR 5,23).	Fumo, Número de dentes, Idade, Condições dentária, Etnia e raça
Tezal et al. 2005 EUA	131 pacientes com tumor e 323 pacientes com lesões pré-cancerígenas de 13,798 pacientes	Coorte	Tumor Lesões pré-cancerígenas Lesões orais em tecido mole	Severidade da doença periodontal através da perda de inserção clínica (PI) \geq 1,5 mm	Aumento significativo de se ter tumor oral (OR 4,57) e lesões pré-cancerígenas (OR 1,55) com PI 1,5 m em não fumantes.	Idade e gênero, Número de dentes, Raça e etnia, Educação, Fumo, Álcool
Rosenquist et al. 2005 Suécia	132 casos de tumores 320 controles	Caso-controle	Estágios de carcinoma de I a IV de língua, assoalho de boca, da cavidade oral e orofaringe	Perda dentária Radiografias panorâmicas e periapicas para a perda óssea horizontal e angulares	Aumento significativo o risco de ter carcinoma para higienização razoável (OR 2) e pobre (OR 5,3) álcool e para perda de mais de 20 dentes (OR 3,4) após ajuste para fumo e álcool Houve aumento de risco para perda óssea radiográfica, mas não quando ajustado para fatores.	Idade e gênero, Condições e número de dentes, Educação, Fumo, Álcool
Sharma et al. 2011 India	20 pacientes com leucoplasia e periodontite pré-existente 20 pacientes com periodontite e sem leucoplasia 20 controles	Caso-controle	Grau de displasia das lesões deleucoplasia e níveis de IL-6 na saliva	Periodontite crônica através de PS \geq 4mm e PI de acordo com a OMS (1997)	Aumento significativo nos níveis de IL-6 em pacientes com periodontite com e sem leucoplasia comparado ao controle. No grupo com leucoplasia o nível de IL-6 aumentou de acordo com a severidade da displasia. O nível de IL-6 foi maior em fumantes comparado a não fumantes em todos grupos.	Homens Fumo
Hiraki et al. 2008 Japão	429 pacientes com cancer de cabeça e pescoço de 5240 pacientes com câncer 10.480 controles	Caso-controle	Câncer de cabeça e pescoço	Perda dentária	Aumento significativo para câncer de cabeça e pescoço para o número reduzido de dentes (OR 1,68 para desdentados) após ajuste para fumo e álcool.	Fumo Álcool Número de dentes Dieta Gênero Idade

Variáveis sócio-demográficas

Fernandez – Garrote et al. 2001 Cuba	200 casos de câncer oral e orofaringe e 200 controles	Caso-controle	Câncer oral e de orofaringe	Perda dentária	Aumento significativo de câncer oral (OR 2,7) em pacientes com perda de 16 ou mais dentes, após ajuste para fumo e consumo de álcool.	Dieta Fumo Consumo de álcool
de Rezende et al. 2008 Brasil	50 pacientes com câncer de células escamosas de origem oral e orofaríngeo e 50 pacientes controle	Caso-controle	Câncer oral e de orofaringe	CPITN e DMF	76% dos indivíduos do grupo com câncer apresentaram bolsas periodontias maiores que 6mm comparados a 10% do grupo controle. Não houve cálculo de razão de risco(OR), e não houve associação com DMFT.	-
Guha et al. 2007 Brasil	924 casos de câncer oral e orofaríngeo e 928 controles na Europa; 2286 casos e 1824 controles na América Latina	Caso-controle	Câncer oral e de orofaringe	Condição dental ao exame (boa, regular, pobre) aferida por presença de cálculo, sangramento, irritação da mucosa e presença de cárie. Perda dentária	Condição oral pobre significou aumento de risco para câncer de cabeça e pescoço (OR 2,89 na Europa e OR 1,89 na América Latina). Doença periodontal (indicada pela pobre condição de saúde oral e perda de dentes) e uso diário de colutório podem ser fatores independentes associados ao câncer de cabeça, pescoço e esôfago.	Fumo Consumo de álcool
Zheng et al. 1990 China	404 casos e controles pareados	Caso-controle	Câncer oral	Perda dentária	Aumento significativo de risco de câncer oral com aumento do número de dentes perdidos (mais de 15 dentes perdidos, OR 5,3 para homens e OR 7,3 para mulheres).	Fumo Álcool

Legenda: OR= Odds Ratio; PI= Perda de inserção; PS= Profundidade de sondagem; OMS= Organização Mundial da Saúde; CPITN= (Índice Peridontal comunitário de necessidades de tratamento (The community periodontal index of treatment needs); DMF= Índice de dentes cariados, perdidos e restaurados (Decayed, Missing, Filled index); IL-6= Interleucina 6.

Diversos fatores são apontados como possível plausibilidade biológica da inter-relação entre doenças periodontais e câncer. O fator pró-inflamatório que tange ambas as patologias parece ser a melhor explicação de como essa possível associação possa ocorrer. Estima-se que a inflamação em resposta a infecções de caráter crônico desempenham um papel de 15 a 20% nas malignidades, e que os causadores para esta transformação maligna dos tecidos são os eventos genéticos, os leucócitos infiltrativos tumorais e os principais reguladores da inflamação do câncer (ALLAVENA et al., 2008). O mecanismo proposto para inter-relação entre o processo envolvendo as infecções crônicas, como a doença periodontal, e o câncer se dá pela seguinte sequência: (a) alteração fisiológica do hospedeiro, como a inflamação causada pelas bactérias; (b) modificação da linfoproliferação de antígenos pela influência da infecção; (c) aumento da proliferação de células epiteliais causado pelo desequilíbrio hormonal; (d) efeito direto na transformação celular; (e) produção de metabólitos tóxicos e carcinogênicos pelos microorganismos (CHANG, PARSONNET, 2010).

Sabe-se que as lesões de câncer oral são capazes de alterar os mecanismos de ação de mediadores inflamatórios tanto localmente quanto sistemicamente. Contudo, a possível influência dessa alteração inflamatória sobre outras patologias infecto-inflamatórias, como a doença periodontal, até o presente momento, não foi analisada. O entendimento das condições locais e sistêmicas que possam modular a etiopatogênese das doenças periodontais demonstra-se de considerável relevância devido ao comprometimento na qualidade de vida que essas patologias possam apresentar ao longo do tempo nos indivíduos. Assim, estudos que avaliem a plausibilidade biológica e os efeitos de diferentes situações, como o câncer oral, que modulam a resposta do hospedeiro, sobre as condições que afetam o periodonto são necessários.

4. Modelos Experimentais Animais de Indução de Doença Periodontal e Carcinoma Oral

A dificuldade de desenvolvimento de estudos em humanos que almejam evidenciar a plausibilidade de influência dos processos biológicos sobre o processo saúde-doença dos tecidos periodontais é um fator presente. Frente a essa dificuldade, ocorre o crescimento de estudo com modelos laboratoriais e em animais que permitem aos pesquisadores a utilização de métodos que não seriam éticos em pesquisas realizadas em seres humanos, principalmente em relação à administração de drogas que tenham consequências físicas e

patológicas (TABAKOFF, HOFFMAN, 2000). Na pesquisa científica, os modelos animais vêm sendo amplamente empregados devido às similaridades biológicas, principalmente relacionadas aos processos fisiopatológicos. A similaridade entre humanos e alguns animais em termos anatômicos, histológicos, histopatológicos e bioquímicos dos tecidos periodontais, e relativa similaridade microbiológica, demonstra a efetividade da utilização dessa metodologia (SUSIN, RÖSING, 2002; KUHR et al., 2004; OZ, PULEO, 2011). Por meio do desenvolvimento de modelos em ratos, é possível a indução de uma doença periodontal que apresenta características muito semelhantes àquela observada em seres humanos. As diferenças existentes entre o homem e o rato, não têm sido consideradas como um fator suficientemente importante, em estudos experimentais, para que esse modelo possa ser desconsiderado (KLAUSEN, 1991).

Da mesma forma, o processo de formação de câncer de língua induzido em ratos é muito semelhante com aquelas contidas na literatura no que se refere ao desenvolvimento do carcinoma em humanos (KANOJA, VAIDYA, 2006; RIBEIRO, SALVADORI, 2007). O objetivo dos modelos de carcinogênese química é fornecer melhor compreensão das várias etapas desse processo, buscando investigar os riscos causados pelos agentes ambientais bem como desenvolver estratégias para o diagnóstico precoce e ações preventivas (KANOJA, VAIDYA, 2006 & RIBEIRO, SALVADORI, 2007). O agente alquilante 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) é um dos agentes químicos mais adotados, pois constitui um método experimental de carcinogênese da mucosa oral, principalmente lingual, que reproduz a sequência dos estágios de hiperplasia, displasia, displasia severa e carcinoma *in situ* de maneira semelhante àquela da cavidade oral de seres humanos (RIBEIRO, SALVADORI, 2007; MINICUCCI et al., 2011). A utilização do 4NQO diluído em água apresenta-se como uma metodologia mais fácil, segura e efetiva comparada com aplicação tópica com pincel relacionada a outros agentes químicos (DAYAN et al., 1997; TANG et al., 2004).

Considerando a relevância do tema proposto relacionado às patologias envolvidas e a ausência de estudos experimentais, em modelo animal, abordando a inter-relação entre câncer e a influência na doença periodontal, o objetivo da presente dissertação foi avaliar o impacto de um modelo de indução de câncer lingual, com exposição ao carcinógeno 4NQO, na severidade da perda óssea alveolar em ratos. A realização de um estudo dessa natureza busca auxiliar na elucidação de processos etiopatogênicos envolvidos tanto na carcinogênese induzida pelo agente alquilante 4NQO quanto na doença periodontal.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Analisar a inter-relação entre exposição ao carcinógeno 4NQO e doença periodontal em ratos Wistar.

2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar o efeito da exposição ao 4NQO sobre o processo de remodelação óssea alveolar induzida por ligadura e espontânea em ratos Wistar.

ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO 4- NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO) SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA E ESPONTÂNEA EM RATOS WISTAR

Marcelo Ekman Ribas^a

Tobias Rauber Spuldaro^a

Harry Juan Rivera Oballe^a

Juliano Cavagni^a

Eduardo José Gaio^a

Marcelo Lazzaron Lamers^b

Cassiano Kuchenbecker Rösing^a

^aDepartamento de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

^bDepartamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Autor para correspondência:

Cassiano Kuchenbecker Rösing

**Endereço: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2492, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,
Telefone +55 51 33085318; Fax, email: ckrosing@hotmail.com**

RESUMO

Objetivo: analisar o efeito da exposição ao carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) sobre a perda óssea alveolar espontânea e induzida. *Materiais e métodos:* oitenta e quatro ratos Wistar, machos, foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo 1 (Controle total); Grupo 2 (Exposição ao 4NQO); Grupo 3 (Perda óssea alveolar); Grupo 4 (Exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar). Os grupos 2 e 4 foram expostos ao carcinógeno, diluído em água (50ppm), por vinte semanas. A perda óssea alveolar foi induzida, por meio de ligaduras de seda no segundo molar superior direito dos animais, nos grupos 3 e 4, sendo no grupo 4, após a exposição ao 4NQO. Após decorridas vinte semanas do protocolo experimental os ratos foram mortos e foram coletadas as maxilas e línguas para análise. Foi realizada análise macroscópica das línguas e análise morfométrica da perda óssea alveolar das maxilas realizada por meio de fotografias digitais padronizadas. A análise estatística foi realizada por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para avaliar a perda óssea nos diferentes grupos, e teste ANOVA, com *post hoc* de Bonferroni, para análise do peso corporal (significância $p < 0,05$). *Resultados:* setenta e um animais completaram o estudo. Todos os animais expostos ao 4NQO apresentaram lesões macroscópicas na língua ao final do protocolo experimental, demonstrando que a exposição ao carcinógeno foi efetiva. Nos lados em que houve indução de destruição periodontal, para os grupos 3 e 4, observa-se que o modelo gerou maior perda óssea, com diferenças estatisticamente significativas comparadas aos grupos 1 e 2, nos quais não houve indução de doença periodontal. Considerando-se a destruição periodontal espontânea, os resultados do lado esquerdo dos animais demonstram que os grupos 1 (0.41; 0.38-0.43) e 3 (0.44; 0.41-0.46) foram aqueles com menores perdas ósseas, sendo que os grupos 2 (0.45; 0.41-0.48) e 4 (0.51; 0.44-0.67) apresentaram perdas ósseas superiores ao grupo 1. A análise da perda óssea alveolar, demonstrou diferenças significativas entre exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar espontânea. *Conclusão:* Pode-se concluir que a exposição ao carcinógeno 4NQO potencialmente influencia a perda óssea alveolar espontânea em ratos.

Palavras Chave: Câncer oral, doença periodontal, metabolismo ósseo, inflamação, ratos.

INTRODUÇÃO

As evidências científicas, nos últimos anos, têm demonstrado que existe uma associação importante entre infecções/inflamação localizadas, como a doença periodontal, e inter-relação com outros efeitos adversos sistêmicos como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, partos prematuros e baixo peso neonatal, diabetes, osteoporose, Alzheimer e, recentemente, o câncer (WILLIAMS, OFFENBACHER, 2000; SCANNAPIECO, 2005; MUSTAPHA et al., 2007; STEIN et al. 2012). O suporte científico associando câncer e doença periodontal vem crescendo substancialmente. Já existem evidências importantes amparando essa relação, com enfoque importante relacionado ao câncer oral (TEZAL et al., 2007; MONTOVANI, ALLAVENA, BALKWILL, 2008; TEZAL et al. 2009; FITZPATRICK, KATZ, 2010).

O câncer oral, em conjunto com câncer orofaríngeo, é considerado a décima malignidade mais comum entre homens no mundo (VARED, DAYAN, 2013). No Brasil, para o ano de 2012, ocorreram 14.170 novos casos de câncer oral, sendo 9990 homens e 4180 mulheres, o que ocupa a sétima colocação em termos de incidência dentre todos os tipos de câncer (INCA, 2013). Apesar de uma tendência geral de decréscimo observada na frequência de câncer oral e faríngeo, parece haver uma tendência maior de ocorrência de câncer lingual, principalmente em pessoas mais jovens (MARUR, FORASTIERE, 2008; VARED, DAYAN, 2013). No país, a localização que mais comumente está relacionada ao carcinoma bucal é a língua, seguido pelo assoalho bucal e o lábio inferior. O carcinoma epidermóide, o tipo mais comum, corresponde, no Brasil e no Reino Unido, a cerca de 90% a 95% dos cânceres orais (BRENER, BARBOSA, GRANDINETTI, 2007). O número elevado de casos de câncer oral e sua mortalidade estão relacionados a uma pré-disposição individual ligada a características genéticas específicas e à exposição a carcinógenos como tabaco, consumo de álcool, e deficiência de micronutrientes (PETTI, 2009).

O carcinoma epidermóide oral possui capacidade de invasão dos tecidos ósseos maxilares, potencialmente influenciando o metabolismo de reabsorção (JIMI et al. 2011; HWANG et al. 2012); entretanto, o entendimento dos mecanismos de invasão óssea provenientes do tumor ainda não estão totalmente elucidados. O microambiente tumoral é um sistema complexo que envolve muitos tipos de células, desde células endoteliais e células precursoras até células do tipo macrófago, dendríticas, fibroblastos de vários fenótipos,

miofibroblastos, neutrófilos e outros granulócitos (eosinófilos e basófilos), mastócitos e linfócitos natural killer, que participam na progressão do tumor (ALBINI, SPORN, 2007). A progressão da invasão óssea requer o estabelecimento de uma interação funcional entre as células cancerosas e as células ósseas, onde ocorre a produção local de fatores secretados pelas células do tumor que estimulam a formação osteoclástica (HWANG et al. 2012). Tem sido relatado que a reabsorção óssea pelos osteoclastos é um procedimento importante para o processo de invasão óssea na malignidade dos carcinomas orais. As células cancerosas invadem os tecidos circundantes, a fim de ampliar sua massa tumoral por meio de enzimas proteolíticas, tais como as metaloproteinases de matriz. A reabsorção óssea osteoclástica fornece o espaço e nutrientes necessários para o desenvolvimento das células cancerosas no tecido ósseo (DEYAMA et al. 2008).

Considerando que tanto o câncer oral quanto a doença periodontal apresentam influência sobre a perda óssea ao longo do tempo, somando-se à importância deste assunto e complexidade da inter-relação entre essas patologias, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da exposição ao carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) sobre a perda óssea alveolar espontânea e induzida. Para tanto, um modelo de indução experimental de neoplasia bucal foi utilizado.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Características e Distribuição da Amostra

O protocolo experimental do presente estudo segue a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei nº 11.794 (08.10.2008) e obedece a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais, sendo aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais em pesquisa (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (protocolo nº 22959).

Foram utilizados 84 ratos Wistar machos de 60 dias, pesando em média 250g e provenientes do biotério central da UFRGS. O estudo foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas

coletivas de polipropileno (cinco animais em cada gaiola), recebendo ração balanceada para roedores e água *ad libitum* ou solução preparada com cancerígeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais em número de acordo com cálculo amostral prévio.

O presente estudo utilizou a perda óssea alveolar como desfecho principal, e como referência para o cálculo de tamanho amostral, o estudo de Cavagni et al (2005). Justifica-se a escolha deste devido à presença de diferença significativa encontrada na perda óssea alveolar entre os grupos experimentais. Para tal cálculo, utilizou-se a diferença de perda óssea alveolar entre os grupos, representada pelo valor médio de 0.13mm e desvio-padrão de 0.12. Assumindo um poder de estudo de 0.90 e um erro alpha de 0.05, a amostra estimada foi de 18 ratos por grupo experimental. Sabendo-se que aproximadamente 70% dos ratos desenvolve câncer de língua após 20 semanas (KANOJIA,VAIDYA, 2006), estimou-se para o presente estudo o acréscimo de 30% de ratos na amostra dos grupos submetidos à carcinogênese, ou seja, 24 ratos por grupo, enquanto que os demais contaram com 18 animais. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira: Grupo 1 (Controle total) ausência de indução de doença periodontal e ausência de indução de câncer de língua – n=18; Grupo 2 (Exposição ao 4NQO), com exposição ao carcinógeno e ausência de indução de doença periodontal – n=24; Grupo 3 (Perda óssea alveolar) indução de doença periodontal e ausência de exposição ao 4NQO – n=18; Grupo 4 (Exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar): Após 20 semanas (150 dias) de exposição ao carcinógeno, foi induzida doença periodontal por 15 dias – n=24. O peso corporal dos animais foi monitorado durante o experimento, tendo sido aferido nos dias 0, 30, 60, 90, 120 e 150.

Todas as etapas experimentais do estudo estão expressas na Figura 1.

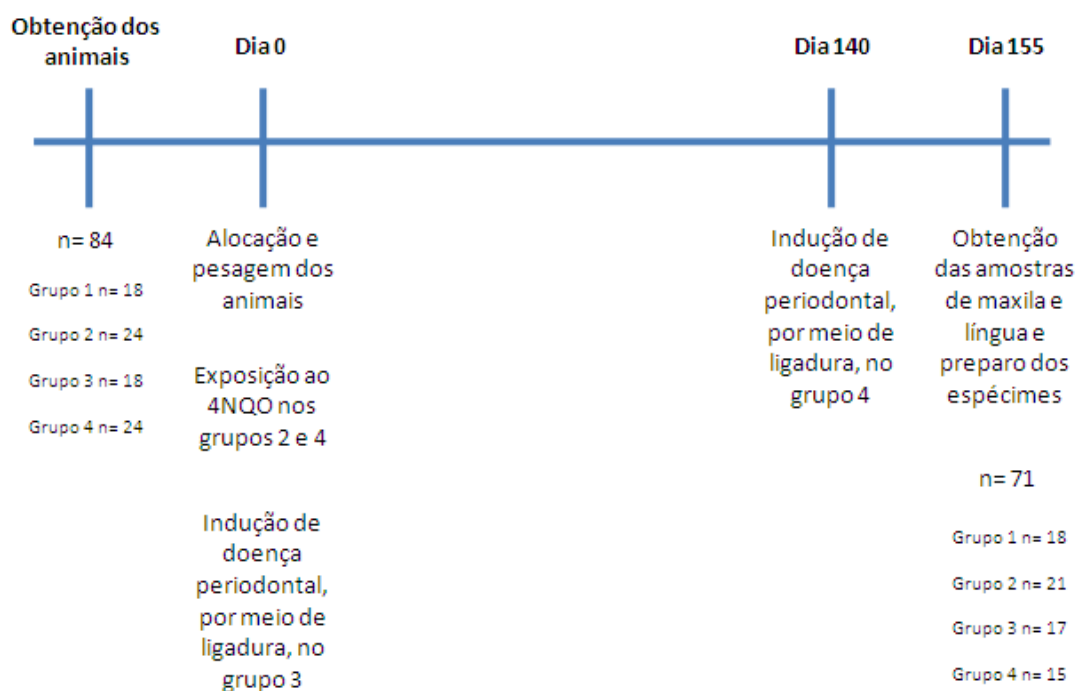


Figura 1- desenho esquemático das diferentes fases experimentais do estudo

Grupo 1 - (Controle total) ausência de indução de doença periodontal e ausência de indução de câncer de língua; Grupo 2 (Exposição ao 4NQO), com exposição ao carcinógeno e ausência de indução de doença periodontal; Grupo 3 (Perda óssea alveolar) indução de doença periodontal e ausência de exposição ao 4NQO; Grupo 4 (Exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar): Após 20 semanas de exposição ao carcinógeno, foi induzida doença periodontal por 15 dias.

2.2. Exposição ao carcinógeno

O carcinógeno 4NQO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi administrado diluído em água filtrada até atingir 50ppm, por meio da diluição de 50mg de 4NQO em pó por litro de água destilada. As soluções foram preparadas semanalmente e armazenadas em frascos com isolamento para luz, devidamente identificados, devido à fotólise e periculosidade do carcinógeno (conforme orientações do fabricante na bula do produto). Os grupos que foram expostos ao carcinógeno receberam as garrafas com água concentrada a 50ppm de 4NQO e estas foram isoladas com papel alumínio, sendo o líquido repostado três vezes por semana. Sendo o 4NQO uma substância cancerígena de relevante periculosidade para humanos, o preparo da solução, bem como sua reposição, obedeceram o protocolo de utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e manipulação específicos conforme indicação do fabricante do produto (Sigma, St. Louis, MO, EUA):

- Uso de óculos de proteção;
- Luvas reforçadas;

- Máscara com filtro de proteção tipo P2 (EN143).

A indução do câncer foi realizada durante 20 semanas conforme estudo prévio (RIBEIRO, SALVADORI, 2007).

2.3. Indução de Doença Periodontal

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

2.4. Morte dos Animais e Obtenção das Peças Maxilares

Os animais foram mortos após decorridas 20 semanas do início da fase experimental, conforme explicitado na Figura 1. A morte dos animais foi realizada por decapitação, 24 horas após a última avaliação in vivo e após jejum de 12 horas. Este método foi utilizado com o intuito de permitir a coleta de maiores volumes de sangue para as análises sorológicas futuras do projeto. As maxilas dos animais foram removidas com auxílio de cinzéis e, após, armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%, devidamente etiquetados com o número do animal e grupo ao qual pertencia. A mucosa palatina na região de molares foi removida por meio de duas incisões paralelas realizadas com lâminas 15c montadas em cabo Bard Parker número 3 juntamente com descoladores tipo micro freer. As peças foram armazenadas em cassetes próprios com identificação do lado no qual as ligaduras foram colocadas. As maxilas foram imersas em

hipoclorito de sódio a uma concentração de 9% de cloro ativo, durante cinco horas, e os tecidos moles mecanicamente removidos após. Passado este período, as peças foram lavadas e secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, foram coradas com azul de metileno a 1% durante um minuto, lavando-se e secando-se novamente para remover excessos da solução (FERNANDES, et al., 2007).

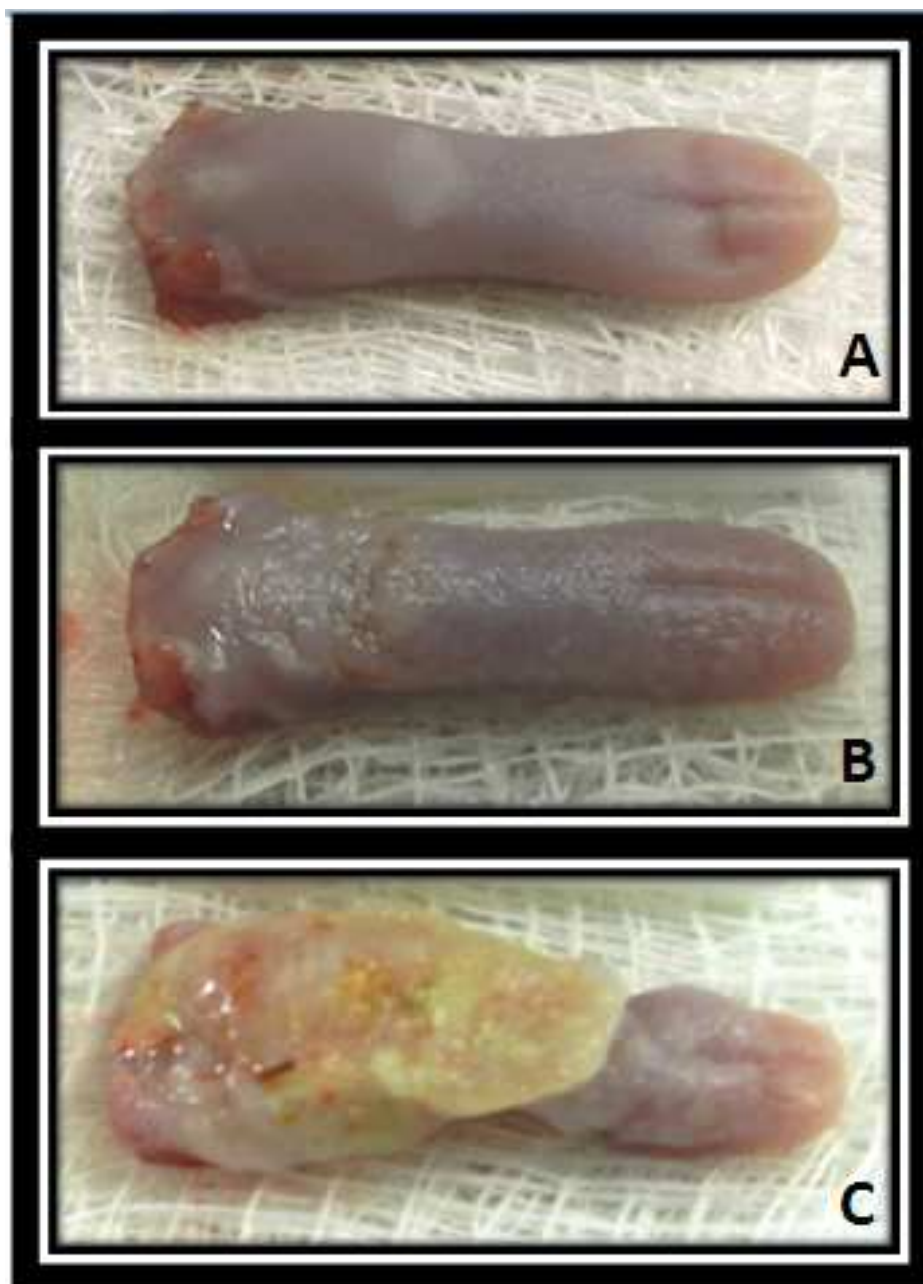
2.5. Análise Morfométrica da Progressão de Perda Óssea

A análise morfométrica da perda óssea alveolar seguiu a metodologia proposta por FERNANDES et al. (2007). Para a tomada das fotografias foi utilizada uma câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que o cone fique o mais paralelo possível em relação ao solo. Foi confeccionado um aparato utilizando pasta pesada de Silicona de Adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo. Foram realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das peças (hemimaxilas) sendo que a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea foi realizada por meio do programa Image Tool 3.0, por um examinador calibrado e cego em relação ao grupo experimental a que pertenciam os espécimes. Para calibração, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos para serem duplamente mensurados, com uma semana de intervalo. O coeficiente de correlação intra-classe dessas medidas foi de 0,96 Para fins de comparação da perda óssea foram feitas dez medidas lineares (perpendiculares ao solo) da junção amelo-cementária, sendo cinco na face vestibular e cinco na face palatina. Para cada face, foram realizadas duas medidas na raiz mesial, duas na distal e uma na região de furca. A perda óssea dos dentes foi gerada a partir da média das medidas lineares, um único examinador foi responsável pela análise.

2.6. Análise Macroscópica das Línguas

Todas as línguas dos animais participantes do presente estudo foram macroscopicamente analisadas. Fotografias foram, também realizadas. A Figura 2 demonstra as línguas de um animais expostos e não expostos ao carcinógeno.

Figura 2 – Macroscopia das línguas de um animal não exposto ao carcinógeno (A) e de um animal exposto ao 4NQO com lesão menos pronunciada (B) e de um animal exposto ao 4NQO com lesão maior (C).



Durante a fase experimental do estudo, treze animais morreram, sendo setenta e um animais restantes incluídos na análise.

Os resultados relativos ao desfecho principal do presente estudo são expressos em mediana e intervalos interquartis de 25 e 75%, sendo apresentados nas Figuras 3 e 4. Nos lados em que houve indução de destruição periodontal, para os grupos 3 (0.75; 0.72-0.79) e 4 (0.77; 0.67-0.81), observa-se que o modelo gerou maior perda óssea, com diferenças estatisticamente significativas comparadas aos grupos 1 (0.42; 0.39-0.43) e 2 (0.45; 0.38-0.52), nos quais não houve indução de doença periodontal. Considerando-se a destruição periodontal espontânea, os resultados do lado esquerdo dos animais demonstram que os grupos 1 (0.41; 0.38-0.43) e 3 (0.44; 0.41-0.46) foram aqueles com menores perdas ósseas, sendo que os grupos 2 (0.45; 0.41-0.48) e 4 (0.51; 0.44-0.67) apresentaram perdas ósseas superiores ao grupo 1. Observa-se que a exposição ao carcinógeno gerou diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos não expostos.

Figura 3 : Mediana (percentil 25 e 75) da Perda Óssea Alveolar espontânea (mm) de acordo com os diferentes grupos experimentais (n=64)

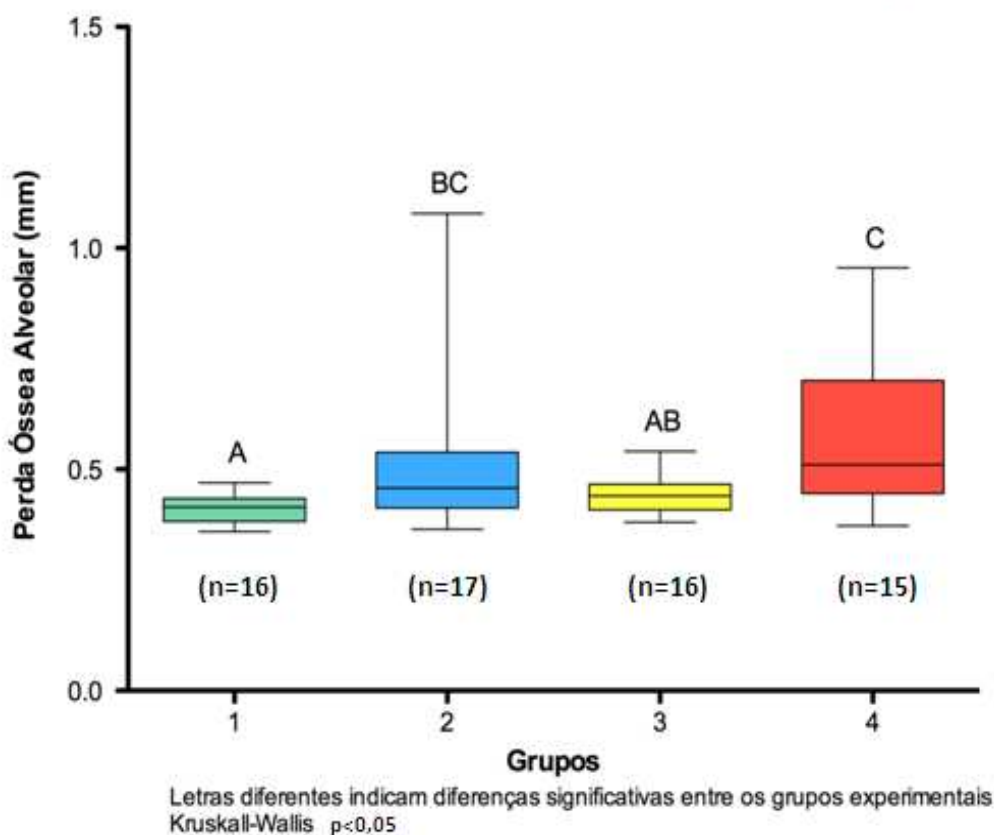
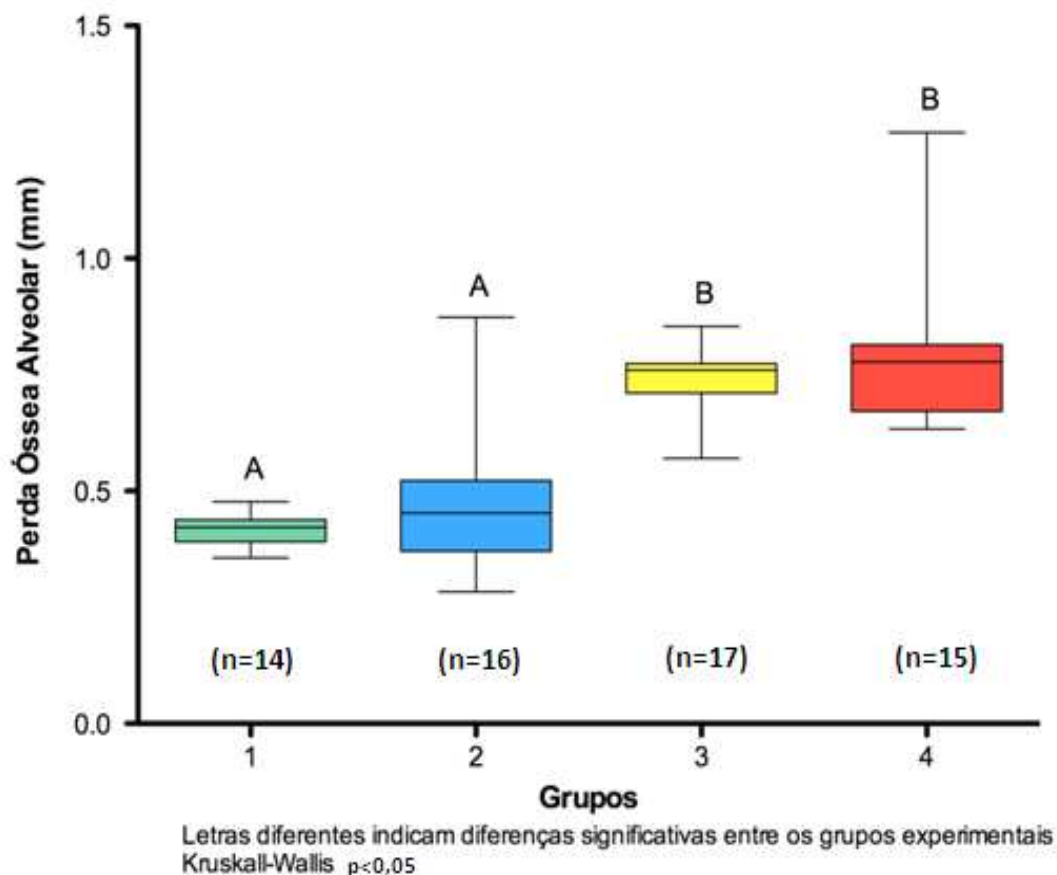


Figura 4 : Mediana (percentil 25 e 75) da Perda Óssea Alveolar induzida (mm) de acordo com os diferentes grupos experimentais (n=62)



Em relação as alterações macroscópicas observadas nas línguas dos animais ao longo do experimento, nos grupos não expostos ao 4NQO, não foram observadas lesões macroscópicas nas línguas. Para fins ilustrativos, informa-se que todos os animais submetidos a exposição ao 4NQO desenvolveram lesões macroscópicas na língua.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da exposição ao carcinógeno 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) sobre a perda óssea alveolar induzida e espontânea em ratos Wistar. O contexto do estudo dessa associação vincula-se à possibilidade de verificar possíveis relações entre câncer e doenças periodontais. Até o momento, na literatura vigente, estudos experimentais em modelo animal que analisam esta relação são inexistentes. Os resultados

demonstram que a exposição ao carcinógeno foi capaz de gerar lesões proliferativas nas línguas dos animais e de influenciar a perda óssea alveolar espontânea.

Com o intuito de compreender os fatores pelos quais este resultado possa ser elucidado, é importante que a metodologia utilizada e os resultados sejam colocados em perspectiva e analisados frente à literatura vigente. O modelo experimental de indução de câncer lingual pela exposição ao 4NQO, durante 20 semanas, utilizado neste estudo, é o mesmo utilizado por outros trabalhos (RIBEIRO, SALVADORI, 2007; MIRANDA et al., 2011). Nos referidos estudos, observou-se o desenvolvimento de câncer lingual em aproximadamente 70% dos animais. No estudo em tela, lesões proliferativas macroscopicamente visíveis foram observadas nas línguas de todos os animais. Esse fato permite inferir que o modelo de utilização do carcinógeno 4NQO foi efetivo experimentalmente.

Para se ter uma melhor compreensão sobre o estado de saúde geral dos animais, o peso corporal foi monitorado. Ao longo do experimento, observou-se que houve um ganho de peso de 20-30% para todos os grupos experimentais, independente da exposição ao carcinógeno. Esses resultados são válidos para os animais que permaneceram até o final do período experimental. Esse fato não pode ser interpretado como ausência de efeitos da exposição ao 4NQO sobre a saúde geral dos animais. Destaca-se, entretanto, o fato de que 13 animais morreram antes de completar o estudo, corroborando dados da literatura que relatam a morbidade elevada relativa à exposição ao 4NQO (RIBEIRO, SALVADORI, 2007).

Neste estudo foi realizada indução de doença periodontal, em ratos Wistar, por meio de ligadura, sendo essa metodologia amplamente utilizada em estudos relacionados a patogênese periodontal, sendo reconhecido como um modelo adequado (FINE, 2009; OZ, PULEO, 2011). Este modelo de indução de doença periodontal apresenta características semelhantes às observadas em seres humanos. As diferenças existentes entre o ser humano e o rato, não têm sido consideradas como um fator determinante para que essa metodologia seja desconsiderada (KLAUSEN, 1991). Entretanto, é importante que se tenha claro que a translação da informação não deve ser direta. Recentemente, estudos têm procurado compreender achados com modelos de doença periodontal em roedores e têm sugerido que tanto as análises por meio de doença induzida como a ocorrência de doença espontânea têm potencial de demonstrar aspectos importantes do processo etiopatogênico. Essa metodologia é utilizada tanto em estudos analisando comparações com hemiarcadas contralaterais do tipo boca dividida, quanto estudos sem nenhum tipo de indução de destruição periodontal. Além disso, a análise da perda óssea espontânea pode contribuir para o aumento do potencial de

comparação translacional dos estudos. Isso é possível visto que, em alguns modelos experimentais, a quantidade de agressão que a presença da ligadura permite acumular possa ser um desafio de magnitude muito grande, não permitindo que sutis diferenças possam ser detectadas (LIBERMAN et al., 2011; CAVAGNI et al. 2013).

No que diz respeito ao número final de animais presentes no presente estudo, além das perdas de animais durante o período de exposição ao carcinógeno, ocorreram perdas durante a obtenção e processamento das peças, o que explica o número diferente de análises nas hemiarcadas (64 maxilas analisadas no lado esquerdo e 62 maxilas analisadas no lado direito). Um fato interessante a ser relatado é que a obtenção das maxilas em animais expostos ao carcinógeno fica dificultada, com freqüente ocorrência de fratura da peça antes de seu preparo final, o que impede sua utilização para análise. É importante ressaltar que todas as análises realizadas no presente estudo vinculam-se exclusivamente aos animais que permaneceram durante todo o experimento.

Tendo em vista que o presente estudo tem como cenário a relação entre câncer e o desenvolvimento de doença periodontal destrutiva, é importante ressaltar que todos os animais expostos ao carcinógeno (Grupos 2 e 4) desenvolveram lesões proliferativas macroscopicamente visíveis na língua. A análise dessas lesões será objeto de estudos adicionais do presente projeto. Também foram observadas lesões clinicamente detectáveis em outros órgãos, provavelmente refletindo metástases em pulmão, fígado, etc. Nesse sentido, esses achados apontam para o fato de que o modelo de indução de neoplasia foi eficaz.

Assim, é importante tentar compreender como poderia ser explicada a eventual relação entre presença de câncer e a patogênese da destruição periodontal. As lesões tumorais orais são capazes de alterar o equilíbrio inflamatório tanto local quanto sistemicamente (SAHEBJAMEE et al., 2008; AGGARWAL, GEHLOT, 2009; KOROSTOFF et al., 2011; GASCHE et al., 2011). Considerando este fato, emerge a possibilidade de essas alterações inflamatórias apresentadas nas lesões de câncer oral modularem patologias igualmente relacionadas ao processo inflamatório, como a doença periodontal. Neste estudo, foi observado que na hemiarcada onde foi realizada indução de destruição óssea periodontal nos grupos experimentais, por meio de ligadura, a exposição ao carcinógeno não foi capaz de modificar a perda óssea alveolar de forma significativa. Este fenômeno pode ser explicado, em parte, pela resposta imunológica do hospedeiro frente à agressão aos tecidos periodontais ou, conforme já sugerido, pelo excessivo desafio representado pela presença da ligadura e dos microrganismos a ela aderidos.

Sabe-se que a patogênese das doenças periodontais envolve tanto a resposta imunológica inata quanto adaptativa (PAGE, 1991; KORNMAN, PAGE, TONETTI, 1997). A resposta imunológica e inflamatória nos tecidos periodontais é única, diferente de outros processos no corpo, particularmente em relação à anatomia do periodonto e da característica única da infecção (KAYAL, 2013). O processo inflamatório que ocorre na doença periodontal caracteriza-se pela infiltração de células leucocitárias, que promovem relativa limitação de invasão bacteriana, contudo, também está relacionado à progressão da destruição óssea ao longo do tempo (KAYAL, 2013). Essas observações têm sido pano de fundo de uma compreensão mais contemporânea do dinamismo do processo inflamatório. Por ser um processo natural de defesa, a inflamação tem potenciais de auxiliar na manutenção da homeostase e, em situações de maior agressividade, esse processo acaba por gerar consequências negativas, incluindo destruição tecidual. No desenvolvimento de lesões de câncer oral, o processo de resposta imune, principalmente relacionado às células linfocitárias, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de proteção contra malignidade (da SILVEIRA et al., 2010). A resposta imune depende de múltiplos fatores, sendo capaz tanto de proporcionar uma resposta benéfica protetora contra displasias, quanto promovendo desenvolvimento tumoral. Cada componente individual imunológico pode atuar de forma diferente nas diversas fases tumorais, e já é comprovado que, em um primeiro momento, o sistema imune reage e diminui a progressão tumoral (MANTOVANI, ALLAVENA, BALKWILL, 2008; de COSTA et al., 2012; PIVA et al., 2013). A resposta imunológica, sob perspectiva local, desencadeada pelo desenvolvimento de lesão periodontal, aliada a resposta imune frente à agressão do carcinógeno, pode ter contribuído, em um primeiro momento, para diminuição da influência que as alterações celulares decorrentes da exposição ao 4NQO possam ter sobre a perda óssea. Este achado deve ser observado com cautela, uma vez que as alterações inflamatórias e a resposta imunológica apresentam inúmeros fatores complexos e não totalmente elucidados. Também deve-se considerar que estes fatores contribuem de forma consistente para a desenvolvimento e progressão tanto das alterações tumorais, quanto da patogênese da doença periodontal, ao longo do tempo.

Por outro lado, no que tangencia a análise da perda óssea espontânea, pode-se observar no presente estudo que houve diferença significativa relacionando a exposição ao carcinógeno e a progressão de destruição óssea. Este fato pode ser explicado, em parte, pela ausência da ativação da resposta imune local óssea defensiva inicial, ocasionada pela agressão aos tecidos periodontais, presente na indução de doença peridontal. O modelo de indução de câncer oral pelo carcinógeno 4NQO é amplamente descrito na literatura, com resultados

marcantes após 20 semanas de exposição (KANOJA, VAIDYA, 2006; RIBEIRO, SALVADORI, 2007). As células dos tecidos expostos ao carcinógeno são capazes, ao longo do tempo, referente ao desenvolvimento tumoral, de produzir citocinas e quimiocinas que podem influenciar a resposta dos tecidos circundantes. A relação com o tecido ósseo acontece principalmente relacionado a capacidade de invasão apresentado por estas células. A reabsorção óssea pelas células osteoclásticas é um importante passo para a invasão do osso nos tumores malignos orais. As células do câncer possuem a capacidade de produzir mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α . Esses mediadores são capazes de estimular não só o crescimento e desenvolvimento tumoral, mas também a diferenciação de células hematopoiéticas em osteoclastos ativos para reabsorção e invasão óssea (OKAMOTO et al., 2000; SAHEBJAMEE et al., 2008; FUKUDA et al., 2010; GASCHÉ et al., 2011). O agente alquilante 4NQO também apresenta a capacidade de determinar alterações *per se* nos tecidos gengivais (RIBEIRO, SALVADORI, 2007). Em conjunto, também possui a capacidade de ocasionar dano oxidativo precoce no DNA dos tecidos orais expostos, semelhante ao tabaco e consumo de álcool em humanos (MIRANDA et al., 2011). Estes dados também suportam a ocorrência de maior perda óssea espontânea no grupo experimental exposto ao carcinógeno, sem presença de ligadura na hemiarcada contralateral, quando comparado ao grupo controle, sem nenhum tipo de exposição.

No momento, é precoce que se façam afirmações contundentes a respeito dos mecanismos pelos quais a relação entre exposição a um carcinógeno e o desenvolvimento de doença periodontal. É possível que o papel sinérgico/antagônico da associação destas exposições sobre o metabolismo ósseo deva-se a uma alteração local e/ou sistêmica de moléculas sinalizadoras comuns, como as interleucinas, que acabam por influenciar o comportamento de osteoblastos e osteoclastos. Os achados do presente estudo apontam para uma possível relação, que deve ser objeto de contínuo estudo como, por exemplo, a análise do perfil sérico de interleucinas. Nesse sentido, pode-se concluir que a exposição ao carcinógeno 4NQO potencialmente influencia a perda óssea alveolar espontânea em ratos.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B., GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr. Opin. Pharmacol.** v.9, n.4, p.351-69, 2009.

ALBINI, A., SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nature.** v.7, p.139-46, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 24 de out. 2013.

BRENER, S. J., F. A.; BARBOSA, A. A; GRANDINETTI, H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.53, n.1, p.63-9, 2007.

CAVAGNI, J., et al. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Braz Oral Res.**, v.19, n.4, p.290-4, 2005.

CAVAGNI, J., et al. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. **Archives of Oral Biology.** v.58, n.8, p.1034-9, 2013.

de COSTA, A. A., et al. Characterization of the evolution of immune phenotype during the development and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Immunol. Immunother.** v.61, p.927-39, 2012.

DEYAMA, Y., et al. Oral squamous cell carcinomas stimulate osteoclast differentiation. **Oncology Reports.** v.20, p.663-8, 2008.

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

FINE, D. H. Of mice and men: animal models of human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.** v.36, p.913-14, 2009.

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

FUKUDA, M., et al. IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. **International Journal of Oncology.** v.36, p.1355-65, 2010.

GALVAO, M. P., et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Braz. Oral Res.** v.17, n.5, p.62, 2003.

GASCHE, J. A., et al. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. **Int. J. Cancer.** v.129, n.5, p.1053-63, 2011.

HWANG, Y. S., et al. Secretion of IL-6 and IL-8 from lysophosphatidic acid-stimulated oral squamous cell carcinoma promotes osteoclastogenesis and bone resorption. **Oral Oncology.** v.48, p.40-48, 2012.

JIMI, E., et al. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases.** v.17, p.462-468, 2011.

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

KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **Biomed. Res. Int.** 2013:639368. doi: 10.1155/2013/639368.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v.62, n.1, p.59-73, 1991.

KORNMAN, K. S., PAGE, R. C., TONETTI, M. S. Hehostresponse to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000.** v.1997, n.14, p.33-53, 1997.

KOROSTOFF, A., et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. **Oral Oncology.** v.47, p.282-287, 2011.

LIBERMAN, D. N., et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Archives of Oral Biology**. v.56, n.2, p.109-13, 2011.

MARUR, S., FORASTIERE, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo. Clin. Proc.** v.83, n.4, p.489-501, 2008.

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**. v.454, n.7203, p.436-44, 2008.

MIRANDA, S. R., et al. Oxidative DNA damage is a preliminary step during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J. Mol. Hist.** v.42, p.181-6, 2011.

MUSTAPHA, I. Z., et al. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. **J. Periodontol.** v.78, n.12, p.2289-302, 2007.

OKAMOTO, M., et al. Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. **Cancer**. v.89, n.9, p.1966-75, 2000.

OZ, H. S., PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011:754857. doi: 10.1155/2011/754857

PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontal Res.** v.26, n.3, p.230-42, 1991.

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

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v.45, n.4-5, p.340-50, 2009.

PIVA, M. R., et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. **Oncol. Lett.** v.5, n.6, p.1909-14, 2013.

RIBEIRO, D. A., SALVADORI, D. M. Gingival changes in wistar rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Eur. J. Dent.** v.1, n.3, p.152-7, 2007.

SAHEBJAMEE, M., et al. Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v.13, n.5, p.292-5, 2008.

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

SCANNAPIECO, F. A. Systemic effects of periodontal diseases. **Dent. Clin. North. Am.** v.49, n.3, p.533-50, 2005.

da SILVEIRA, E. J. D., Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Experimental and Molecular Pathology.** v.88, p.171-5, 2010.

STEIN, P. S., et al. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.** v.8, n.3, p.196–203, 2012.

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

TEZAL, M., et al. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.** v.18, n.9, p.2406-412, 2009.

VARED, M., DAYAN, D. Tongue cancer: an ongoing problem which needs new therapeutic approaches. **Harefuah.** v.152, n.6, p.352-5, 2013.

WILLIAMS, R. C.; OFFENBACHER, S. Periodontal Medicine: the emergence of a new branch of periodontology. **Periodontol. 2000.** v.23, n.9-12, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve como objetivo avaliar, em modelo animal, a possível inter-relação entre a exposição a um carcinógeno e doença periodontal. Isso porque, frente à literatura vigente, observa-se que o câncer oral e a doença periodontal são patologias com caráter inflamatório importante. A justificativa para realização deste estudo baseia-se no intuito de buscar elucidar mecanismos biológicos da possível associação das lesões de câncer oral e da doença periodontal possam ter sobre o metabolismo ósseo. Para tanto, um modelo experimental conjunto de indução de câncer lingual e indução de doença periodontal foi escolhido. Também é importante ressaltar que, até o presente momento, este é o primeiro estudo que avaliou este protocolo experimental de indução de câncer lingual relacionando-o com perda óssea alveolar e destruição periodontal. Também foi incluída análise de perda óssea alveolar espontânea, sem nenhum estímulo externo, por ser uma análise também amplamente utilizada em pesquisas relacionadas à etiopatogênese da destruição periodontal

Os resultados apresentados demonstram que a exposição ao 4NQO não foi capaz de influenciar a perda óssea alveolar induzida pelo estímulo da ligadura, influenciando somente a perda óssea alveolar espontânea. Estes achados devem ser observados com cautela, uma vez que as alterações inflamatórias e a resposta imunológica envolvidos em ambas as patologias apresentam inúmeros fatores complexos e não totalmente elucidados. Também deve-se considerar que estes fatores contribuem de forma consistente para a desenvolvimento e progressão tanto das alterações tumorais, quanto da patogênese da doença periodontal, ao longo do tempo. Em um primeiro momento, é precoce que se façam afirmações contundentes a respeito dos mecanismos pelos quais a relação entre exposição a um carcinógeno e o desenvolvimento de doença periodontal. Os achados do presente estudo, de forma pioneira, apontam para uma possível relação entre doença periodontal e câncer oral sobre o metabolismo ósseo, o que deve ser objeto de contínuo estudo.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B., GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr. Opin. Pharmacol.** v.9, n.4, p.351-69, 2009.

AHN, J., SEGERS, S., HAYES, R. B. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. **Carcinogenesis.** v.33, n.5, p.1055-58, 2012.

ALLAVENA, P., et al. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.18, n.1, p.3-10, 2008.

BERGSTROM, J., et al. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. **J. Clin. Periodontol.** v.27, p.61-8, 2000.

BOYLE, P., LEVIN, B. World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008. 512p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 24 de out. 2013.

BRENER, S. J., F. A.; BARBOSA, A. A; GRANDINETTI, H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.53, n.1, p.63-9, 2007.

BUNDGAARD, T., et al. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. **Cancer Causes & Control.** v.6, p.57-67, 1995.

CHANG, A. H.; PARSONNET, J. Role of bacteria in oncogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.23, n.4, p.837-57, 2010.

DAYAN, D., et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncol.** v.33, n.2, p.105-9, 1997.

DEYAMA, Y., et al. Oral Squamous Cell Carcinomas Stimulate Osteoclast Differentiation. **Oncology Reports**. v. 20, p.663-68, 2008.

EBERSOLE, J. L., et al. Differential gender effects of a reduced calorie diet on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. **J. Periodontal Res.** v.43, n.5, p.500-7, 2008.

FERNANDEZ-GARROTE, L., et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oropharynx in Cuba. **British Journal of Cancer**. v.85, p.46-54, 2001.

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

FRONIE, A., et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. **Rom. J. Morphol. Embryol.** v. 54, n.2, p.343-348, 2013.

FUKUDA, M., et al. IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. **International Journal of Oncology**. v.36, p.1355-65, 2010.

GASCHE, J. A., et al. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. **Int. J. Cancer**. v.129, n.5, p.1053-63, 2011.

GEURS, N. C., et al. Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontol.* 2000. v.32, p.105-110, 2003.

GONDIVKAR, S. M., et al. Chronic periodontitis and the risk of head and neck squamous cell carcinoma: facts and figures. **Experimental Oncology**. v.35, n.3, p.163-167, 2013.

GUHA, N., et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **American Journal of Epidemiology**. v.166, p. 1159-73, 2007.

HERNADEZ-GUERRERO, J-C. et al. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma.

Mexico City's General Hospital experience. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.18, n.2, p.306-11, 2013.

HIRAKI, A., et al. Teeth loss and risk of cancer at 14 common sites in Japanese. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention A Publication of the American Association for Cancer Research cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.** v.17, p.1222-7, 2008.

HUJOEL, P. P., et al. An exploration of the periodontitis–cancer association. *Ann. Epidemiol.* v.13, p.312– 16, 2003.

HWANG, Y. S., et al. Secretion of IL-6 and IL-8 from Lysophosphatidic Acid-stimulated Oral Squamous Cell Carcinoma Promotes Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Oral Oncology.* v.48, p.40-48, 2012.

IRFAN, U. M., DAWSON, D. V., BISSADA, N. F. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. **J. Int. Acad. Periodontol.** v.3, n.1, p.14-21, 2001.

JIMI, E., et al. The Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Invasion by Oral Squamous Cell Carcinoma. **Oral Diseases.** v.17, p.462-68, 2011.

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

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.** v.62, n.1, p.59-73, 1991.

KOROSTOFF, A., et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. **Oral Oncology.** v.47, p.282-287, 2011.

KRÜGER, M., et al. The correlation between chronic periodontitis and oral cancer. **Case Reports in Dentistry.** v. 2013, 2013.

KUHR, A., et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.** v.39, n.2, p.101-6, 2004.

LIU, K. Z., et al. In vivo determination of multiple indices of periodontal inflammation by optical spectroscopy. **J. Periodontal Res.** v.44, n.1, p.117-24, 2009.

LIU, L., et al. Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.391, n.1, p.1000-6, 2010.

LUNDQVIST, L., et al. The importance of stromal inflammation in squamous cell carcinoma of the tongue. **J. Oral Pathol. Med.** v.41, p.379-83, 2012.

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature.** v.454, n.7203, p.436-44, Jul. 2008.

MARSHALL, J. R., et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. **European Journal of Cancer Part B. Oral Oncology.** v.28B, p.9-15, 1992.

MARUR, S., FORASTIERE, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo. Clin. Proc.** v.83, n.4, p.489-501, 2008.

MATTILA, K. J., et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. **Bmj.** v.298, p.779-81, 1989.

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

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

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

MINICUCCI, E. M., et al. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp. Toxicol. Pathol.** v.63, n.5, 2011.

Van MONSJOU, H. S., et al. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral. Oncol.** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.00>.

OKAMOTO, M., et al. Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. **Cancer**. v.89, n.9, p.1966-75, 2000.

OZ, H. S., PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011:754857. doi: 10.1155/2011/754857

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

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v.45, n.4-5, p.340-50, 2009.

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

QUAN, J., et al. Potential molecular targets for inhibiting bone invasion by oral squamous cell carcinoma: a review of mechanisms. **Cancer Metastasis Rev.** v.31, p.209-19, 2012.

de REZENDE C. P., et al. Oral health changes in patients with and oropharyngeal cancer. **Brazilian Journal of Otolaryngology**. v. 74, p.596-600, 2008.

RIBEIRO, D. A., SALVADORI, D. M. Gingival changes in wistar rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. **Eur. J. Dent.** v.1, n.3, p.152-7, 2007.

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

SAHEBJAMEE, M., et al. Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v.13, n.5, p.292-5, 2008.

SCANNAPIECO, F. A. Systemic effects of periodontal diseases. **Dent. Clin. North. Am.** v.49, n.3, p.533-50, 2005.

SHAIK, M. M., et al. How do periodontal infections affect the progression of type 2 diabetes and alzheimer's disease?. **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.** v.18, 2013.

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

SHENOI, R., et al. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: a retrospective study. **Mini symposium: head and neck.** v.49, p.21-6, 2012.

SUSIN, C., RÖSING, C. K. O rato como modelo para estudo das repercussões do estresse nas doenças periodontais. **Revista Periodontia.** v.13, p.7-17, 2002.

de SOUZA, B. C., et al., Impact of gingival inflammation on changes of a marker of muscle injury in young soccer players during training: a pilot study. **Rev. Odonto Cienc.** v. 27, n.4, p.294-9, 2012.

TABAKOFF, B., HOFFMAN, P. L. Animal models in alcohol research. **Alcohol. Res. Health.** v.24, n.2, p.77-84, 2000.

TALAMINI, R., et al. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. **British Journal of Cancer.** v. 83, p.1238-42, 2000.

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

TAYLOR, G.W., et al. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. **Ann. Periodontol.** v.3, p.30-9, 1998.

TEZAL, M., GROSSI, S. G., GENCO, R. J. Is periodontitis associated with oral neoplasms? **Journal of Periodontology**. v.76, p.406-10, 2005.

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

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

VERED, M., DAYAN, D. Tongue cancer: an ongoing problem which needs new therapeutic approaches. **Harefuah**. v. 152, n.6, p.352-358, 2013.

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

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO****Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:****Número:** 22959**Título:** INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E CÂNCER LINGUAL INDUZIDO POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO (4NQO) EM RATOS WISTAR**Pesquisadores:****Equipe UFRGS:**

CASSIANO KUCHENBECKER ROSING - coordenador desde 01/06/2012

MARCELO LAZZARON LAMERS - coordenador desde 01/06/2012

Marcelo Ekman Ribas - pesquisador desde 01/06/2012

Tobias Rauber Spuldaro - pesquisador desde 01/06/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 17/09/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 108 ratos Wistar, machos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 28 de Setembro de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – ANÁLISE QUALITATIVA DOS ACHADOS MACROSCÓPICOS DAS LÍNGUAS ANALISADAS

Alterações macroscópicas	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
RUGOSIDADE	0	14	0	15
LESÃO LEUCOPLÁSICA	0	7	0	11
LESÃO ERITROPLÁSICA	0	0	0	0
LESÃO ERITROLEUCOPLÁSICA	0	10	0	5
LESÃO EXOFÍTICA	0	8	0	14
LESÃO ULCERADA	0	1	0	0
ATINGINDO 1/3 DA SUPERFÍCIE LINGUAL	0	4	0	5
ATINGINDO 2/3 DA SUPERFÍCIE LINGUAL	0	10	0	7
ATINGINDO TODA A SUPERFÍCIE LINGUAL	0	4	0	4

Grupo 1 - (Controle total) ausência de indução de doença periodontal e ausência de indução de câncer de língua; Grupo 2 (Exposição ao 4NQO), com exposição ao carcinógeno e ausência de indução de doença periodontal; Grupo 3 (Perda óssea alveolar) indução de doença periodontal e ausência de exposição ao 4NQO; Grupo 4 (Exposição ao 4NQO e perda óssea alveolar): Após 20 semanas de exposição ao carcinógeno, foi induzida doença periodontal por 15 dias.