

RICARDO RIBEIRO GAMA

**Efeitos de quimioprevenção dos ligantes do PPAR- $\alpha$  e dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo uso de 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos Swiss**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Oncologia  
Orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

São Paulo  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gama, Ricardo Ribeiro

Efeitos de quimioterapia dos ligantes PPAR- $\gamma$  e dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo uso de 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos Swiss / Ricardo Ribeiro Gama. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Oncologia.

Orientador: André Lopes Carvalho.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Quimioprevenção  
3.Tiazolidinedionas 4. Ácidos graxos poliinsaturados 5.Camundongos

USP/FM/DBD-182/10

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

©reprodução autorizada pelo autor

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos pacientes portadores de câncer nos quais a “luta” para sobreviver ao aceitarem os tratamentos propostos me incentiva a pesquisar cada vez mais como prevenir doença que traz consigo tanto sofrimento, mas ao mesmo tempo nos abre os olhos ao mostrar, com esta “batalha”, que nada é mais precioso do que a vida.

Não poderia deixar de dedicar também aos animais de laboratório; seres vivos dos quais usufruímos de seu organismo com o intuito de salvar vidas humanas. Apesar da causa ser nobre, sabemos que, por mais que evitemos, estes animais de alguma forma sofrem, não podendo deixar de aqui expressar o meu mais profundo respeito pela vida de animais tão importantes para nós e sua crucial relevância no avanço da medicina humana.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Mirna, cujo exemplo como professora e pesquisadora foi essencial para que eu também seguisse a carreira acadêmica. A realização deste trabalho em muito é consequência de seu incentivo e crédito na pós-graduação e na pesquisa em nosso país.

Ao meu pai, Antônio, pelo apoio e suporte necessários para que um filho obtenha uma boa formação profissional, na qual a pós-graduação está inserida.

A minha esposa, Jeanne, cujo carinho e apoio foram essenciais durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Lopes Carvalho, cujo conhecimento e sabedoria científica o destacam como um dos grandes pesquisadores em câncer no Brasil. Sua forma de orientar, ideias e constante suporte possibilitaram que, apesar da orientação a distância, este trabalho pudesse ser realizado e concluído com êxito.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Oncologia da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Roger Chammas, pelo incentivo e crédito em minha pesquisa.

Aos patologistas Allan Giovanini e Daniel Ogata por todo trabalho prestado no laboratório de anatomia patológica, desde o preparo do material até os laudos das peças e fotos da microscopia. À patologista Ana Paula Sebastião, pela pronta ajuda em entregar parte das fotos da microscopia.

À médica Ana Flávia Costa, na época acadêmica, e aos então acadêmicos Carolina Talini, Denise Feniman, Douglas Kamei, Celso Júnior e Allan Coco pelo auxílio constante no trato com os animais de laboratório e no preparo das dietas e do 4-NQO.

À responsável pelos laboratórios da Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR), Rosinei do Vale, pelo auxílio nos assuntos pertinentes aos laboratórios.

Aos bioteristas, Mauri Souza Bueno, Gilmar Barbosa Bueno e Waldiclei Domingues, pelo cuidado com os animais da pesquisa e constante trabalho nas dependências do biotério ou do laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da FEPAR.

À técnica do laboratório de Bioquímica da FEPAR, Priscila Rodrigues, pela manipulação e preparo semanal do 4-NQO.

À médica veterinária, Maria Fernanda Torres, responsável pelo biotério da Universidade Positivo, pelo fornecimento dos camundongos Swiss.

À bioquímica, Fernanda Scarmato de Rosa, pelo pronto interesse e auxílio na idealização da receita da dieta dos animais contendo os agentes de quimioprevenção.

Ao Prof. Dr. André Vettore de Oliveira, da Universidade Federal de São Paulo, pelo fornecimento do 4-NQO, no início da pesquisa.

Às bioquímicas do laboratório *Cosmética* de, Curitiba, pelo fornecimento das cápsulas de ômega-3.

Ao laboratório Abbott, na figura da representante Mirian Moritz, pelo fornecimento do Actus<sup>®</sup> (pioglitazone).

Ao técnico do laboratório de Patologia Bucal da Universidade Positivo, Elieser Luciano de Jesus, pelo preparo dos blocos de parafina e confecção das lâminas de microscopia.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE SIGLAS .....	16
RESUMO .....	17
SUMMARY .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Justificativa para a pesquisa e delimitação do problema .....	21
1.2 Modelos animais de indução de CCECP e carcinogênese induzida pelo 4-NQO.....	24
1.3 Quimioprevenção: definição, finalidade, formas e histórico em CCECP.....	34
1.4 Quimioprevenção em CCECP: novos compostos em estudo em modelos animais.....	41
1.5 PUFAS ômega-3: forma de atuação como agente quimiopreventivo e seu uso em animais de laboratório .....	47
1.6 Agonista PPAR- $\gamma$ : forma de atuação como agente quimiopreventivo ou potencial agente pró-tumoral e seu uso em animais de laboratório ...	54
2 OBJETIVOS .....	65
3 MÉTODOS .....	66
3.1 Informações gerais do estudo.....	66
3.2 Indução da carcinogênese – Fase 1 .....	70
3.3 Quimioprevenção – Fase 1 .....	71

3.4	Indução da carcinogênese – Fase 2 .....	72
3.5	Quimioprevenção – Fase 2.....	74
3.6	Necrópsia e avaliação histológica .....	76
3.7	Procedimento metodológico do preparo do material para microscopia..	77
3.8	Método da análise da incidência das diferentes lesões pré-invasoras e invasoras na mucosa da VADS .....	83
3.9	Análise estatística.....	83
4	RESULTADOS.....	85
4.1	Efetividade do modelo de indução tumoral de CCE da via aerodigestiva superior em camundongos Swiss.....	85
4.2	Aspecto macroscópico e microscópico das lesões tumorais .....	86
4.3	Estudo da evolução da carcinogênese no período entre a ausência de lesões macroscópicas e o início do aparecimento das lesões invasoras..	102
4.4	Análise da incidência de neoplasias invasoras da VADS .....	109
4.4.1	Incidência de neoplasias da VADS entre grupos submetidos ou não à quimioprevenção com óleo de peixe .....	110
4.4.2	Incidência de neoplasias da VADS entre grupos submetidos ou não à quimioprevenção com pioglitazone .....	117
4.4.3	Incidência de neoplasias da VADS no grupo 4-NQO 25.....	128
4.5	Análise da mortalidade entre grupos.....	129
4.6	Análise das curvas de sobrevida entre grupos .....	132
5	DISCUSSÃO .....	140
5.1	Efetividade do modelo de indução tumoral de CCE da via aerodigestiva superior em camundongos Swiss e comparação com outros modelos animais na literatura .....	140
5.2	Estudo da evolução da carcinogênese no período entre a ausência de lesões macroscópicas e o início do aparecimento das lesões invasoras..	149



5.3	Análise da mortalidade entre os grupos controle e da incidência de neoplasias da VADS nos modelos de indução com 25, 50, 100 µg/ml de 4-NQO.....	154
5.4	Critérios utilizados para averiguar a incidência das diferentes lesões pré-invasoras e invasoras na mucosa da VADS .....	158
5.5	Análise da mortalidade entre grupos submetidos à quimioprevenção com óleo de peixe e impacto da ação do mesmo na incidência de neoplasias da VADS .....	161
5.6	Análise da mortalidade entre grupos submetidos à quimioprevenção com agonista PPAR- $\gamma$ -pioglitazone e impacto da ação do mesmo na incidência de neoplasias da VADS .....	171
5.7	Perspectivas futuras.....	184
6	CONCLUSÃO .....	185
	ANEXOS .....	186
	REFERÊNCIAS .....	187

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo experimental I.....	72
Figura 2 - Protocolo experimental II .....	75
Figura 3 - Fixação da peça língua/esôfago/estômago .....	88
Figura 4 - CCE verrucoso de língua .....	88
Figura 5 - CCE exofítico de língua.....	88
Figura 6 - CCE ulcerado de língua.....	88
Figura 7 - CCE padrão infiltrativo de língua.....	89
Figura 8 - CCE verrucoso em assoalho da boca .....	89
Figura 9 - CCE padrão infiltrativo de assoalho de boca .....	89
Figura 10 - Diversas lesões dispersas em língua – áreas neoplásicas e pré-neoplásicas .....	89
Figura 11 - Sincronicidade tumoral em órgãos da VADS – CCE de língua (seta preta) e de esôfago (seta branca).....	89
Figura 12 - Associação de CCE padrão infiltrativo de assoalho da boca (seta branca) com displasia discreta a moderada de língua (seta preta) .....	89
Figura 13 - Microfotografia do epitélio de língua com intensa hiperqueratose, HE 40X.....	90
Figura 14 - Microfotografia com perda de estratificação no terço inferior do epitélio de língua – displasia leve a moderada, HE 40X.....	90
Figura 15 - Microfotografia com perda da estratificação acima de dois terços do epitélio da língua, hiper cromasia nuclear, alteração da relação do volume núcleo/citoplasma – carcinoma <i>in situ</i> , HE 40X.....	90
Figura 16 - Microfotografia com carcinoma verrucoso de língua, HE 40X.....	91
Figura 17 - Microfotografia com CCE bem diferenciado invasor de língua, HE 40X.....	91
Figura 18 - Microfotografia com CCE pouco diferenciado invasor de língua, HE 100X.....	91
Figura 19 - Lesão protrusa polipoide (seta larga) e lesões planas (setas estreitas) de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma <i>in situ</i> .....	94

Figura 20 - Lesões protrusas tipo platô de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma <i>in situ</i> .....	94
Figura 21 - Lesões planas levemente elevadas de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma <i>in situ</i> .....	94
Figura 22 - CCE de esôfago junto à TEG .....	94
Figura 23 - Associação de CCE de esôfago com áreas de displasia e carcinoma <i>in situ</i> .....	94
Figura 24 - Papiloma de esôfago .....	94
Figura 25 - CCE verrucoso de esôfago .....	95
Figura 26 - CCE de esôfago formando uma massa torácica (seta larga) e uma tóraco-abdominal (seta estreita) .....	95
Figura 27 - CCE ulcerado em terço médio de esôfago (seta larga) associado com áreas de carcinoma <i>in situ</i> e/ou CCE submucoso (setas estreitas) .....	95
Figura 28 - Volumosa lesão pré-neoplásica de esôfago – carcinoma <i>in situ</i> .....	95
Figura 29 - Lesões pré-neoplásicas de esôfago protrusas polipoides ou protrusas tipo platô .....	95
Figura 30 - Microfotografia mostrando hiperqueratose de esôfago, HE 40X .....	96
Figura 31 - Microfotografia evidenciando displasia de baixo grau de epitélio esofágico, HE 100X .....	96
Figura 32 - Microfotografia mostrando displasia de alto grau de esôfago, HE 40X.....	96
Figura 33 - Microfotografia mostrando lesão polipoide de esôfago com carcinoma <i>in situ</i> , HE 40X.....	97
Figura 34 - Microfotografia do epitélio esofágico mostra camada muscular própria (asterisco) preservada e acima blocos tumorais infiltrando a submucosa (setas) – CCE invasor submucoso de esôfago, HE 40X..	97
Figura 35 - Microfotografia do epitélio esofágico mostra muscular própria (seta longa) invadida por blocos tumorais de CCE (setas curtas) – CCE invasor até a muscular própria do esôfago, HE 100X.....	97
Figura 36 - Microfotografia do epitélio esofágico mostra mucosa (seta longa) e muscular (asterisco). Blocos tumorais de CCE na adventícia (seta curta) - CCE invasor até a adventícia, HE 40X.....	98

Figura 37 - Linha de separação entre os antros do estômago de camundongos (seta).....	100
Figura 38 - Separação dos epitélios do estômago de camundongos (seta) .....	100
Figura 39 - Epitélio de revestimento do pré-estômago (fundo) é semelhante ao esôfago (seta).....	101
Figura 40 - Visão anatômica da TEG (seta estreita) com volumoso CCE esofágico à esquerda (seta larga).....	101
Figura 41 - CCE do pré-estômago (fundo) com invasão de antro pilórico (seta) .	101
Figura 42 - CCE de TEG com componente esofágico (seta larga) e com componente gástrico (seta estreita) .....	101
Figura 43 - CCE gástrico com invasão de serosa (seta).....	101
Figura 44 - Apresentação inicial de CCE em área de TEG com comprometimento gástrico (seta).....	101
Figura 45 - CCE gástrico (setas) com invasão de toda a parede do órgão, HE 40X.....	102
Figura 46 - Diminuta lesão posterior pré-neoplásica em língua (seta) na quarta semana do camundongo 6 .....	106
Figura 47 - Pequena lesão esofágica pré-neoplásica (seta) na quarta semana do camundongo 7 .....	106
Figura 48 - Pequena lesão pré-neoplásica em língua (seta) vista em camundongo 13 anestesiado na oitava semana .....	107
Figura 49 - Lesão aparente pré-neoplásica em língua (seta) na nona semana do camundongo 14 .....	107
Figura 50 - Carcinoma <i>in situ</i> de esôfago estenosante (seta) na décima segunda semana do camundongo 17 .....	107
Figura 51 - Vários carcinomas <i>in situ</i> de esôfago (setas) na décima quarta semana do camundongo 18 .....	107
Figura 52 - CCE de língua (seta) na décima quinta semana do camundongo 20 .	107
Figura 53 - CCE submucoso de esôfago (seta) na décima quinta semana do camundongo 19 .....	107
Figura 54 - CCE submucoso de esôfago (seta) na décima quinta semana do camundongo 20 .....	108

Figura 55 - Lesão posterior pré-neoplásica em língua (seta) na décima segunda semana do camundongo 17 .....	108
Figura 56 - Aspecto normal da língua na primeira semana após o término da indução tumoral.....	108
Figura 57 - Aspecto normal do esôfago na primeira semana após o término da indução tumoral.....	108
Figura 58 - Aspecto normal do estômago na primeira semana após o término da indução tumoral.....	108
Figura 59 - CCE gástrico tipo <i>linite plástica</i> (seta) .....	125
Figura 60 - Implantes de CCE gástrico em cápsulas esplênica (seta larga preta), renal (seta larga branca) e testiculares (setas estreitas).....	126
Figura 61 - CCE gástrico com <i>linite plástica</i> (seta preta) e disseminação celomática para diafragma (seta branca) .....	126
Figura 62 - CCE gástrico com invasão do fígado por contiguidade (seta).....	126
Figura 63 - Metástases em fígado de CCE gástrico (setas).....	126
Figura 64 - Metástases pulmonares de CCE gástrico (setas).....	126
Figura 65 - CCE gástrico (seta escura) com invasão da porção glandular do estômago (seta clara) – <i>linite plástica</i> , HE 100X.....	127
Figura 66 - CCE gástrico (seta escura) metastático para fígado (seta clara mostra hepatócitos), HE 100X.....	127
Figura 67 - Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos com diferentes doses de 4-NQO.....	133
Figura 68 - Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos com diferentes doses de 4-NQO.....	134
Figura 69 - Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe e pioglitazone .....	135
Figura 70 - Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe e pioglitazone .....	135
Figura 71 - Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese .....	136

Figura 72 - Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese .....	137
Figura 73 - Sobrevida geral nas 24 semanas após término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese.....	138
Figura 74 - Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese .....	139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência e ausência de neoplasias invasoras em VADS entre grupos controle .....	85
Tabela 2 - Macroscopia e microscopia dos animais do estudo da evolução da carcinogênese .....	104
Tabela 3 - Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos I e II .....	111
Tabela 4 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos VIII, X e XI.....	111
Tabela 5 – Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 10%, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral.....	112
Tabela 6 - Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 5%, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral.....	113
Tabela 7 – Incidência de carcinoma invasor do esôfago nos grupos I e II .....	113
Tabela 8 – Incidência de carcinoma esofágico invasor nos grupos VIII, X e XI..	114
Tabela 9 - Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 10%, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago .....	115
Tabela 10 - Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 5%, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago .....	116
Tabela 11 – Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos I e II.....	117
Tabela 12 – Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos VIII, X e XI..	117
Tabela 13 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos I e III .....	118
Tabela 14 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos VIII, XII e XIII ...	118
Tabela 15 - Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral .....	119

Tabela 16 - Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral .....	120
Tabela 17 - Incidência de carcinoma invasor de esôfago nos grupos I e III.....	120
Tabela 18 - Incidência de carcinoma esofágico invasor nos grupos VIII, XII e XIII.....	121
Tabela 19 - Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago .....	122
Tabela 20 - Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago .....	122
Tabela 21 - Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos I e III.....	123
Tabela 22 - Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos VIII, XII e XIII.....	124
Tabela 23 - Distribuição das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral no grupo 4-NQO 25 .....	129
Tabela 24 - Distribuição das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago no grupo 4-NQO 25.....	129
Tabela 25 - Mortalidade geral por grupos nas 24 semanas que sucederam o término do 4-NQO .....	130



## LISTA DE SIGLAS

AA	– ácido aracdônico
AAS	– ácido acetilsalicílico
CCE	– carcinoma de células escamosas
CCECP	– carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	– ciclooxigenase
COX-2	– ciclooxigenase-2
DHA	– ácido docosahexaenoico
DNA	– ácido desoxirribonucleico
EGFR	– receptor do fator de crescimento epidérmico
EPA	– ácido eicosapentanoico
FEPAR	– Faculdade Evangélica do Paraná
HE	– hematoxilina eosina
LOX	– lipooxigenase
NFk $\beta$	– fator de transcrição nuclear k- $\beta$
OP	– óleo de peixe
PPARs	– <i>peroxisome proliferator activated receptors</i>
PPS	– ligantes de PPARs
PPREs	– elementos responsivos específicos do DNA
PUFAS $\omega$ -3	– ácidos graxos poliinsaturados $\omega$ -3
4-NQO	– 4-nitroquinolina-1-óxido
15-PGJ <sub>2</sub>	– prostaglandina J <sub>2</sub>
RAR- $\beta$	– receptor $\beta$ do ácido retinoico
RNA	– ácido ribonucleico
RNA <sub>t</sub>	– ácido ribonucleico transportador
RXRs	– retinoides X receptores
RXR-a	– retinoide X receptor-a
Stat-3	– proteína ativadora de transcrição 3
TEG	- transição esôfago-gástrica
13-cRA	– ácido-13- <i>cis</i> -retinoico
VADS	– via aerodigestiva superior

## RESUMO

Gama RR. *Efeitos de quimioprevenção dos ligantes do PPAR- $\alpha$  e dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo uso de 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos Swiss* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 204p.

**Introdução:** O carcinoma de células escamosas da via aerodigestiva superior (VADS) geralmente é unifocal e advém da progressão das lesões pré-neoplásicas. O risco de segundos tumores primários é de 3 a 7% ao ano para pacientes tratados previamente de câncer da VADS, sendo importante avançar em estratégias de quimioprevenção. Nos estudos clínicos realizados, as drogas promissoras mostraram-se ineficazes quando aplicadas em doses baixas para minimizar a toxicidade. Neste trabalho, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (óleo de peixe) e pioglitazone, um agonista PPAR- $\alpha$ , foram utilizados com intenção quimiopreventiva, em modelo animal de carcinogênese da VADS, induzida com o uso de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO). **Métodos:** Camundongos Swiss foram submetidos à indução tumoral com 4-NQO nas doses: 25, 50 ou 100  $\mu\text{g/ml}$  diluído em água por 8 semanas. Quimioprevenção foi testada com óleo de peixe nas concentrações de 10% ou 5%. Também foi realizada, em outros grupos, quimioprevenção com pioglitazone nas concentrações de 300 ppm ou 100 ppm. A quimioprevenção foi realizada na iniciação e pós-iniciação tumorais (por 32 semanas) ou apenas na pós-iniciação (por 24 semanas). **Resultados:** As incidências de neoplasias oral e esofágica foram, respectivamente, similares entre os grupos 4-NQO 100 – 77,7% e 55,5% e 4-NQO 50 – 72,9% e 37,8%. O grupo 4-NQO 25, ao ser observado 24 semanas a mais, obteve 78,2% de neoplasia oral e 34,7% de esofágica. A mortalidade por câncer nas 24 semanas após o término do 4-NQO foi de 55,6% no grupo 4-NQO 100, de 11,6% no 4-NQO 50 e de 13,6% no 4-NQO 25; sendo significativa na comparação entre os grupos 100 com 50 ( $p < 0,01$ ) e 100 com 25 ( $p < 0,01$ ). Assim, foi observado que 4-NQO 100  $\mu\text{g/ml}$  gerou uma mortalidade mais acelerada neste grupo. A maioria dos animais desenvolvia lesões invasoras em mais de um órgão ou a associação destas com pré-neoplásicas. A incidência de neoplasia oral foi similar na comparação entre o grupo 4-NQO 100 (77,7%) com óleo de peixe 10% (80%) –  $p=1,00$  e com o grupo pioglitazone 300 ppm (61,1%) –  $p=0,27$ . Entre os grupos 4-NQO 50 com óleo de peixe 5% (controle - 72,9%, com óleo de peixe na pós-iniciação - 84,2% e com óleo de peixe na iniciação e pós-iniciação - 64,7%) –  $p=0,34$  e entre os grupos 4-NQO 50 com pioglitazone 100 ppm (controle - 72,9%, com pioglitazone na pós-iniciação - 76,1% e com pioglitazone na iniciação e pós-iniciação - 62,5%) –  $p=0,63$ , a incidência de neoplasia oral foi semelhante na comparação entre os grupos. A presença de neoplasia esofágica não diferiu entre o grupo 4-NQO 100 (55,5%) com óleo de peixe 10% (50%) –  $p=0,73$  e com o grupo pioglitazone 300 ppm (50%) –  $p=0,73$ ; e foi também similar entre os grupos 4-NQO 50 com pioglitazone 100 ppm (controle - 37,8%, com pioglitazone na pós-iniciação - 57,1% e com pioglitazone na iniciação e pós-iniciação - 31,2%) -  $p=0,22$ ; porém diferiu nos grupos 4-NQO 50 com óleo de peixe 5% (controle - 37,8%, com óleo de peixe na pós-iniciação - 68,4% e com óleo de peixe na iniciação e pós-iniciação - 29,4%), sendo estatisticamente significativa -  $p=0,02$ . Interessante foi a observação de que o grupo que realizou

quimioprevenção com pioglitazone desenvolveu câncer gástrico na mesma proporção dos demais grupos, porém apresentou uma doença mais agressiva, com disseminação metastática, fato não observado nos outros grupos. Considerando-se a sobrevivência, não foi observada diferença estatística significativa nas 24 semanas comparando-se os grupos 4-NQO 100 e entre os grupos 4-NQO 50 com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe ou com pioglitazone. **Conclusão:** A indução tumoral com 4NQO, independente da dose, foi obtida com sucesso em camundongos Swiss. Neste estudo, não foram observados efeitos de quimioprevenção do óleo de peixe e do pioglitazone nas diferentes fases da carcinogênese estudadas. O óleo de peixe na pós-iniciação pode ter potencializado a ação carcinogênica do 4-NQO no esôfago, assim como a associação do 4-NQO com o pioglitazone possa ter criado um novo modelo de carcinogênese gástrica, não vista nos grupos que não receberam esta associação.

**Descritores:** Carcinoma de células escamosas, Quimioprevenção, Tiazolidinedionas, Ácidos graxos poliinsaturados, Camundongos.

## SUMMARY

*Gama RR. Chemopreventive effects of PPAR-? ligands and polyunsaturated fatty acids omega-3 on the carcinogenesis process of the upper aerodigestive tract induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in Swiss mice [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 204p.*

**Introduction:** The squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract (UADT) is generally unifocal and arises from the progression of premalignant lesions. Between 3% to 7% of patients with head and neck carcinoma will develop subsequent primary tumors of the UADT annually; therefore, the importance of advancing in new chemopreventive strategies is unquestionable. In clinical studies, promising drugs were ineffective when used at low doses to minimize toxicity. In the present study, the potential chemopreventive effects of polyunsaturated fatty acids omega-3 (fish oil) and of a PPAR-? ligand (pioglitazone) were tested in an animal model of UADT carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) in Swiss mice. **Methods:** The animals underwent tumor induction with 25, 50 or 100 µg/ml of 4-NQO diluted in water for eight weeks. Chemoprevention was tested with 10% or 5% fish oil and with 300 ppm or 100 ppm pioglitazone in other groups. Chemoprevention was conducted on tumor initiation and postinitiation for 32 weeks or only on postinitiation for 24 weeks. **Results:** The incidence rates of oral and esophageal neoplasms were similar between groups 4-NQO 100 (77,7% and 55,5%, respectively) and 4-NQO 50 (72,9% and 37,8%, respectively). Group 4-NQO 25 was followed for 24 weeks longer than the others and showed incidence rates of 78,2% for oral neoplasia and 34,7% for esophageal neoplasia. Cancer-related mortality rates in the 24 weeks following the conclusion of the tumor induction phase were 55,6%, 11,6% and 13,6% in groups 4-NQO 100, 4-NQO 50 and 4-NQO 25, respectively. The differences were statistically significant when comparing groups 100 with 50 ( $p < 0,01$ ) and 100 with 25 ( $p < 0,01$ ). The dose of 100 µg/ml 4-NQO led to faster mortality compared with 50 µg/ml or 25 µg/ml 4-NQO. Most animals developed invasive lesions in more than one site of the UADT or, more frequently, an association of premalignant and malignant lesions. The incidence of oral neoplasia was similar in the comparison of the control group 4-NQO 100 with 10% fish oil (77,7% vs 80%,  $p = 1,00$ ) or with 300 ppm pioglitazone (77,7% vs 61,1%,  $p = 0,27$ ). Results were also similar when comparing 4-NQO 50 groups with 5% fish oil (control–72,9%, fish oil on postinitiation–84,2%, and fish oil on initiation and postinitiation–64,7%,  $p = 0,34$ ), and between 4-NQO 50 groups with 100 ppm pioglitazone (control–72,9%, pioglitazone on postinitiation–76,1%, and pioglitazone on initiation and postinitiation–62,5%,  $p = 0,63$ ). The incidence of esophageal neoplasia reached no statistical difference either when 4-NQO 100 control group was compared with 10% fish oil (55,5% vs 50%,  $p = 0,73$ ) or with 300 ppm pioglitazone (55,5% vs 50%,  $p = 0,73$ ). The same was true between 4-NQO 50 groups with 100 ppm pioglitazone (control–37,8%, pioglitazone on postinitiation–57,1%, and pioglitazone on initiation and postinitiation–31,2%,  $p = 0,22$ ). Statistically significant differences were found between 4-NQO 50 groups with 5% fish oil (control–37,8%, fish oil on postinitiation–68,4%, and fish oil on initiation and postinitiation–29,4%,

p=0,02). Interestingly, the group receiving chemoprevention with 300 ppm pioglitazone had a gastric cancer incidence rate comparable to that of other groups, but with more aggressive disease and metastatic dissemination, unlike the others. No statistically significant differences were found in the survival rates for the 24-week period after induction when comparing the control groups 4-NQO 100 and 4-NQO 50 with their respective experimental groups, which received chemoprevention with fish oil or pioglitazone. **Conclusions:** Tumor induction with 4-NQO was successfully achieved in Swiss mice, regardless of the dose. In this study, no chemopreventive effects of fish oil or pioglitazone were observed either on postinitiation or on initiation and postinitiation. The introduction of fish oil on the postinitiation phase may have potentialized the carcinogenic action of 4-NQO on the esophageal epithelium; the same can be said about the association of 4-NQO and pioglitazone, which may have created a new model of gastric carcinogenesis not seen in the groups that did not receive that combination of drugs.

**Descriptors:** Carcinoma, squamous cell, Chemoprevention, Thiazolidinediones, Fatty acids, unsaturated, Mice.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa para a pesquisa e delimitação do problema

O carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP) é oriundo de diferentes localizações, como a cavidade oral, que é o local mais frequente, nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, orofaringe, hipofaringe e laringe. Representa a quinta neoplasia mais comum no mundo<sup>1</sup>. Nos Estados Unidos, representa 3,3% de todas as malignidades, sendo estimado que 47.560 americanos desenvolvam CCECP, levando a 11.260 mortes por ano<sup>2</sup>. Estimou-se, em 2009, 500.000 novos casos de CCECP no mundo<sup>1,3</sup>.

Algumas regiões do mundo, incluindo algumas localizações específicas do Brasil, apresentam as maiores incidências de CCECP já vistas, com cerca de 20 casos por 100.000 homens<sup>1,3</sup>.

A incidência de câncer de esôfago é muito variável de acordo com a localização geográfica e hábitos de vida. Além disto, as incidências relatadas de câncer de esôfago são as de carcinoma de células escamosas (CCE) associadas com as de adenocarcinoma, que, via de regra, apresentam fatores de risco distintos. A incidência do carcinoma de células escamosas do esôfago entre americanos é de 3 a 4 casos por 100.000 habitantes. Nos locais onde a prevalência de CCE é maior do que a de adenocarcinoma nos Estados Unidos, como entre consumidores de álcool e tabaco em classes socioeconômicas desfavorecidas, os valores chegam a 28.6 casos por 100.000 habitantes. É uma das neoplasias que se acompanha de uma das mais altas taxas de mortalidade<sup>1,3</sup>.

Durante as últimas duas décadas, muitos artigos têm demonstrado avanços no tratamento do câncer de cabeça e pescoço, com aumento nos índices de sobrevida<sup>4,5</sup>. Carvalho et al.<sup>6</sup>, utilizando uma análise estratificada por sítios da cabeça e pescoço, demonstraram mudanças significativas na apresentação do CCECP e na sobrevida durante o período coletado na base de dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*). Além disso, houve um incremento significativo no prognóstico para CCECP na última década em comparação com as duas décadas anteriores<sup>6</sup>.

Apesar da melhora na sobrevida, o diagnóstico tardio e a incidência de segundos tumores primários são fatores, na maioria das vezes, responsáveis pela mortalidade vista em portadores de CCECP. Tumores diagnosticados em sua fase inicial apresentam sobrevida em cinco anos da ordem de 80%, enquanto que os diagnosticados em fase avançada não chega a 20% no mesmo período<sup>7</sup>. Além disso, o risco de desenvolvimento de um segundo tumor primário, que chega a ser de 3% a 7% ao ano<sup>8</sup>, é considerado a principal causa de falência terapêutica e morte entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço inicial e devidamente tratados no passado<sup>9</sup>.

Como muitos outros tumores epiteliais, CCECP resulta do acúmulo de numerosas alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em múltiplos eventos sequenciais<sup>10</sup>. Essas alterações influenciam em diferentes mecanismos, como os de diferenciação celular, apoptose, proliferação celular, angiogênese, inflamação, resposta imune e metastatização<sup>11</sup>.

A carcinogênese é um processo lento e de múltiplos passos que requer um acúmulo de alterações genéticas, induzidas por um determinado carcinógeno, em um tecido exposto a este<sup>12</sup>. A observação de uma certa frequência de segundos tumores

primários após um câncer da cavidade oral fez com que Slaughter et al.<sup>13</sup> propusessem a teoria do “*campo de cancerização*”. Esta teoria sugere que múltiplos tumores primários individuais podem surgir independentemente no trato aerodigestivo superior como resultado de anos de exposição crônica a carcinógenos. Assim, é importante não apenas tratar adequadamente o CCECP em sua primeira apresentação clínica, mas, também, estudar estratégias de quimioprevenção para que se evite o aparecimento de segundos tumores primários nestes pacientes, o que contribui com um decréscimo importante de sobrevida dos mesmos<sup>14</sup>.

Por quimioprevenção entende-se o uso sistêmico de agentes químicos naturais ou sintéticos para reverter, suprimir ou prevenir a progressão do câncer. As estratégias de quimioprevenção incluem prevenção primária em grupos de alto risco, reversão das lesões pré-malignas e prevenção do segundo tumor primário. A quimioprevenção em câncer de cabeça e pescoço está fundamentada na alteração genética lenta e gradual até a detecção clínica do câncer, o que possibilitaria utilizar drogas quimiopreventivas em pacientes de alto risco (como os com história prévia de câncer da via aerodigestiva superior) ou de tentar reverter lesões pré-malignas diversas. Uma série de agentes farmacológicos são descritos na literatura, como vitaminas, hormônios, anti-hormônios, anti-inflamatórios, dentre outros, como possuindo ação quimiopreventiva. Agentes de quimioprevenção têm sido testados em estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo em CCECP<sup>15</sup>. As respostas promissoras iniciais não conseguiram ser reproduzidas, sendo a toxicidade às diferentes substâncias testadas o principal obstáculo. Assim, é importante avançar em novas estratégias de quimioprevenção, estudando, inicialmente, em animais de laboratório, diferentes substâncias que combinem eficiência e tolerabilidade no controle das



lesões orais pré-malignas e que futuramente possam ser utilizadas com a intenção de minimizar o grande impacto que existe na sobrevida dos pacientes com a progressão destas lesões ou com o aparecimento de segundos tumores primários em indivíduos de alto risco.

Para isto, tem-se criado modelos de carcinogênese temporal da via aerodigestiva superior semelhante ao visto em seres humanos, quando diferentes estágios da carcinogênese se manifestam através de lesões histopatológicas distintas em um mesmo órgão ou na mucosa da via aerodigestiva superior (VADS). Desta forma, lesões pré-neoplásicas e neoplásicas podem ser encontradas na mucosa de um animal semelhantes às vistas na mucosa da VADS de seres humanos induzidas pelo tabagismo. Também, é importante que, uma vez retirado o carcinógeno, a carcinogênese possa progredir e não ser interrompida com a suspensão do agente agressor, ou seja, uma vez mais simulando o processo de carcinogênese comumente visto na mucosa do trato aerodigestivo superior de seres humanos, desencadeada por agentes carcinogênicos como o tabaco e o álcool. Assim, pode-se testar modelos de quimioprevenção que atuem no processo de carcinogênese, revertendo, suprimindo ou interrompendo o mesmo.

## 1.2 Modelos animais de indução de CCECP e carcinogênese induzida pelo 4-NQO

Formas variadas de estudo de CCECP em animais de laboratório têm sido testadas. O enxerto de carcinoma de células escamosas ou a carcinogênese

quimicamente induzida são as utilizadas, cada uma apresentando vantagens e desvantagens.

O enxerto de carcinoma de células escamosas de tumores humanos é feito através da injeção do mesmo em órgãos da cavidade oral (ortotópico) ou fora dela (ectópico)<sup>16</sup>. A necessidade de animais imunodeficientes impede o estudo da interação sistema imune do hospedeiro e tumor que existe em qualquer ser humano portador de câncer. Outro fator importante reside no fato de a injeção de células malignas pular o evento carcinogênico inicial, que é a formação das lesões pré-malignas e seu potencial de progressão para invasão, fato este, na maioria das vezes, presente na carcinogênese da VADS de seres humanos<sup>17</sup>.

A carcinogênese quimicamente induzida em animais de laboratório, como hamster, camundongo e ratos, é feita através da administração de drogas carcinogênicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (encontrados no tabaco), para que todos os passos da carcinogênese possam ser vistos e estudados em um mesmo animal. Já na década de 50 os primeiros trabalhos de indução tumoral com carcinógenos específicos foram publicados<sup>18,19</sup>.

Os primeiros foram em hamster, com a indução de tumores de cavidade oral através da aplicação local de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o 7,12 dimetilbenzantraceno e com o 3,4 benzapireno<sup>18</sup>. O modelo de carcinogênese mais utilizado foi o com 7,12 dimetilbenzantraceno, em hamster<sup>20</sup>. O desenvolvimento das lesões em uma “bolsa” localizada na cavidade oral (*bucal pouch*) ocorria apenas durante a exposição ao carcinógeno, havendo um problema em distinguir as lesões transitórias e reversíveis do epitélio causadas pelo contato direto do carcinógeno com a mucosa e a verdadeira transformação pré-maligna<sup>21</sup>. Como previamente discutido

por certos autores<sup>22-24</sup>, este carcinógeno é altamente irritante ao entrar em contato com a mucosa, causando intensa reação inflamatória local, tornando, assim, difícil o estudo das lesões pré-neoplásicas. Além do mais, os tumores desencadeados por este carcinógeno não possuíam muitas das características histopatológicas dos carcinomas de células escamosas vistos em seres humanos<sup>22</sup>, o que tornava este modelo de indução tumoral pouco fiel ao comumente visto para teste de agentes de quimioprevenção.

O composto nitroso 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) é um derivado de quinolina solúvel em água, cujos metabólitos causam a formação de adutos na molécula de DNA ao se ligarem aos sítios de adenina e guanina<sup>25</sup>. Como consequência, formam-se espécies reativas de oxigênio, como radical superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais induzem o *stress* celular oxidativo, também atuando na molécula de DNA, levando a mutações e quebras na mesma<sup>26,27</sup>; todas alterações genéticas similares às provocadas pelos carcinógenos do tabaco<sup>24,28,29</sup>.

Seu efeito carcinogênico foi inicialmente visto por Nakahara et al<sup>19</sup>. Esta substância tem se mostrado eficaz na indução de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e esôfago em animais de laboratório, como camundongos<sup>21,30,31</sup>. Esta indução produz um modelo de carcinogênese temporal, o que confere a presença de múltiplas lesões pré-neoplásicas, displásicas e neoplásicas no mesmo animal, após determinado período de exposição à droga<sup>12</sup>. Além disso, não desencadeia reação inflamatória local e leva à formação de um amplo espectro de lesões que histopatologicamente são muito semelhantes às vistas na carcinogênese da via aerodigestiva superior de humanos<sup>32,33</sup>. Mesmo cessada a exposição à droga, o processo de carcinogênese continua a progredir, com as primeiras lesões pré-

neoplásicas surgindo semanas após encerrado os diferentes períodos de indução tumoral discutidos na literatura<sup>14,33</sup>.

Muitos carcinógenos necessitam ser ativados *in vivo* para obter atividade carcinogênica<sup>34</sup>. A ação carcinogênica do 4-NQO é iniciada com a redução enzimática de seu grupo nitroso (por ação de enzimas como DT-diaforases), formando a 4-hidroxiaminoquinolina (4-HAQO). A 4-HAQO pode ser, posteriormente, metabolizada e acetilada pela seril-tRNA sintetase para formar o complexo enzimático seril – AMP<sup>35</sup>, na qual ocorre a formação da 4-acetoxiaminoquinolina – 1 – óxido (Ac-4HAQO), que é implicada na formação de adutos covalentes com guanina e adenina no DNA<sup>24,27,36</sup>. Experimentos *in vivo* mostram que o Ac-4HAQO liga-se preferencialmente a resíduos de guanina. Mutações causadas por estes adutos resultam na substituição de guanina por pirimidina<sup>37</sup>.

Caso estas bases modificadas não sejam apropriadamente reparadas, a mutação é incorporada ao genoma, estando assim completa a iniciação tumoral<sup>34</sup>. O processo de ativação ou de inativação de carcinógenos químicos e a habilidade de reconhecer e reparar o DNA são fatores críticos na determinação da suscetibilidade ou resistência à carcinogênese<sup>34</sup>. Muitas enzimas foram identificadas como fazendo parte deste processo: P-450, seril-tRNA sintetase, GST, DT-diaforases, entre outras<sup>34</sup>.

Assim, a resistência do 4-NQO em induzir genotoxicidade e citotoxicidade é influenciada pela proteína de resistência a múltiplas drogas (MRP) e pela glutathione –S- transferase-P (GSTP1-1). O 4-NQO é um substrato para glutathione–S-transferase (GSTs), incluindo GSTP1-1, resultando em conjugado conhecido como QO-SG. Este conjugado pode ser colocado para fora da célula pela MRP. MRP e GSTP1-1

fornecem alto nível de proteção celular contra a formação de adutos de 4-NQO e a citotoxicidade. Entretanto, individualmente, estas duas proteínas fornecem proteção limitada para as células contra os danos mediados pelo 4-NQO<sup>38</sup>. Com isto, é demonstrado que MRP e GSTP1-1 têm importante papel em evitar os processos de iniciação e progressão tumorais na carcinogênese desencadeada pelo 4-NQO.

O modelo de neoplasia induzido pelo 4-NQO é similar ao carcinoma de células escamosas dos humanos também no tocante à expressão de vários genes relacionados à tumorigênese humana estarem afetados<sup>39</sup>. Proteínas de transdução de sinal, do ciclo celular, de sinalização célula-célula, de apoptose, entre outras, que estão alteradas no CCECP, têm sido estudadas em múltiplos estágios da carcinogênese induzida em modelos animais pelo 4-NQO<sup>24</sup>. Estas moléculas têm o potencial de serem utilizadas como marcadores para detecção precoce do câncer oral e podem ajudar a definir qual lesão pré-maligna evoluirá com maior probabilidade para carcinoma<sup>24</sup>. Estas alterações variam em sua apresentação nos diferentes estágios da carcinogênese e é o efeito cumulativo das mesmas que leva à formação da neoplasia invasora. Algumas destas mutações foram descritas na literatura ao estudarem a carcinogênese desencadeada pelo carcinógeno em questão.

Tang et al.<sup>33</sup> demonstraram por imunohistoquímica que muitas das características carcinogênicas dos tumores induzidos pelo 4-NQO são similares às encontradas no carcinoma de células escamosas de cavidade oral e esôfago de humanos, como marcação aumentada para bromodeoxiuridina, aumento da expressão de K-14 – filamento intermediário de proteína de células basais e suprabasais –, e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), bem como redução da expressão do inibidor do ciclo celular p16.

O aumento da expressão de Bcl-2 (conhecida proteína anti-apoptótica) antes das alterações histológicas teciduais mostra modificações precoces nos caminhos da apoptose. Um aumento gradual de Bcl-2 e Bax ocorre à medida que se desenvolve a progressão para o carcinoma de células escamosas oral<sup>40,41</sup>.

Além disso, o dano ao DNA causado pelo 4-NQO induz mutações de p53 que já são observadas no estágio pré-maligno<sup>42</sup>. A presença de instabilidade genômica durante o tratamento com 4-NQO pode ser preditora do risco de progressão para câncer oral<sup>43</sup>.

São também citadas outras alterações neste modelo de carcinogênese experimental que muito se assemelham ao CCECP dos humanos, do ponto de vista molecular: modificação da expressão de marcadores de diferenciação celular como as queratinas, aumento da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), angiogênese sustentada, aumento dos níveis do fator de crescimento vascular endotelial e aumento da atividade da via m-TOR<sup>14,24,44,45</sup>.

Como citado anteriormente, muitas destas alterações ocorrem antes do aparecimento histológico das lesões, enquanto outras ocorrem antes da formação das lesões invasoras, ou seja, na fase de lesões pré-malignas.

Kanojia et al.<sup>24</sup> resumiu as principais alterações dos biomarcadores, que estão documentados na literatura, como ligados ao processo de carcinogênese na via aerodigestiva superior desencadeado pelo uso do 4-NQO, relacionando-as com as fases da carcinogênese em que são comumente vistas: além da superexpressão de Bcl-2, CDK-4 (complexo CDK-ciclina) e a instabilidade genômica precederem as lesões histológicas, o aumento de expressão de ciclina-D1 também está presente nesta fase primordial. Mutação do gene *ras* também foi descrita na fase de iniciação

tumoral<sup>31</sup>. Aumento da expressão de determinadas citoqueratinas como 1 e 14, da telomerase, da PCNA (proteína auxiliar delta da DNA polimerase – marcador de proliferação celular) e alteração de  $\beta$ -catenina (a qual promove interação celular) precedem a formação do carcinoma invasor, estando presentes na fase de lesões pré-malignas. Também nesta fase da carcinogênese, a mutação de p53, da proteína do retinoblastoma - pRB, de p16, de outras citoqueratinas, e a perda de heterozigossidade do gene *ras* estão documentadas na literatura<sup>24,31,46</sup>.

A carcinogênese da cavidade oral pode ser obtida através da aplicação tópica continuada de solução aquosa concentrada de 4-NQO (por escovação) em determinadas áreas da cavidade oral como língua e lábio<sup>47</sup> ou de palato duro<sup>32,48,49</sup>, o que leva à aquisição progressiva de lesões pré-malignas e carcinoma de células escamosas oral.

Tang et al.<sup>33</sup> mostraram que a aplicação do pó de 4-NQO na água dos animais, além de menos laboriosa, é superior no processo de indução do câncer se comparada à aplicação tópica da droga, sendo o suficiente para causar lesões displásicas e carcinoma de células escamosas em mucosa oral e até de esôfago, tanto em camundongos CBA como nos C57BL/6.

Em decorrência do exposto acima, o modelo animal de indução tumoral, pela administração do pó de 4-NQO diluído na água dos animais ou aplicado topicamente nas diferentes áreas da cavidade oral, produz um espectro de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas que são consideradas como modelo preferencial de estudo do carcinoma de células escamosas oral<sup>50</sup>.

Sua grande vantagem reside no fato de desenvolver uma carcinogênese que é considerada paralela àquela ligada ao desenvolvimento do carcinoma de células

escamosas oral de humanos, em decorrência do aparecimento gradual de lesões displásicas formadas pelo longo tempo de ingestão de variadas quantidades do carcinógeno<sup>50</sup>. Além disso, uma vez suspensa a droga, o processo de carcinogênese persiste em progressão. Yuan et al.<sup>31</sup> relatam que as primeiras lesões na via aerodigestiva superior são vistas com oito semanas após o término da exposição à droga e variam de 1.5 mm a 5 mm. Anterior a isto, as lesões displásicas existem, mas são microscópicas, ao menos na cavidade oral<sup>31</sup>.

É muito importante citar que, em contrapartida, o 4-NQO também tem suas limitações como apontado por Nauta et al.<sup>32</sup>. O CCE induzido por este carcinógeno tende a ser altamente diferenciado. Somado a isto, a raridade de metastatização ganglionar e de invasão perineural e a formação de lesões múltiplas, multifocais e confluentes na área tratada são características do CCE induzido pelo 4-NQO – características clínicas e patológicas estas que não são comumente vistas em CCE de humanos.

Diferentes linhagens de roedores, dose e duração de exposição ao 4NQO, além de vias de administração e tempo de observação distintos, estão descritos na literatura com resultados diversos e não consensuais. Estas informações são úteis ao escolher o melhor modelo experimental para investigar os eventos moleculares que contribuem com a progressão do câncer oral e para o teste de novos agentes de quimioprevenção e de estratégias de tratamento<sup>51</sup>.

Tanuma et al.<sup>34</sup> reportam que a suscetibilidade ao 4NQO, em induzir câncer oral, pode variar enormemente entre as diferentes cepas de ratos. Das sete cepas que estudaram, existiu a mais suscetível – por apresentar um gene semidominante de suscetibilidade – e a mais resistente – por apresentar um gene semidominante de



resistência. O cruzamento entre estas linhagens mostrou uma segregação razoável na incidência de câncer, como era de se esperar, em decorrência da combinação dos genótipos. Estes achados fornecem evidência poderosa de a carcinogênese da cavidade oral quimicamente induzida ser um evento multigênico<sup>34</sup>. Expressões distintas de genes e de atividade enzimática ativadora de metabólicos do 4NQO podem interferir com a maior suscetibilidade que determinadas cepas de roedores têm à indução tumoral causada por este composto nitroso<sup>34</sup>.

O estudo em linhagens específicas de camundongos, como os CBA e os C57BL/6, que com frequência são geneticamente manipulados para expressarem versões modificadas de genes relevantes, pode facilitar investigações futuras dos mecanismos moleculares que envolvem os processos de iniciação e progressão do carcinoma de células escamosas do trato aerodigestivo superior induzido pelo 4NQO<sup>51</sup>. São os chamados camundongos transgênicos<sup>11</sup>. Por exemplo, fornecer 4NQO a camundongos com um defeito em um gene supressor de tumor relevante para CCECP poderá levar ao desenvolvimento de tumores que possam melhor refletir a complexibilidade e heterogeneidade àqueles vistos na prática clínica em seres humanos<sup>51</sup>. São exemplos de linhagens de camundongos geneticamente modificados: os **MutaMouse**<sup>52</sup>; camundongos transgênicos com mutação dominante negativa em p53 – **p53<sup>Val135/WT53</sup>** e camundongos com mutação em *ras* – **CB6F1-Tg-*ras*H2**<sup>54</sup>. Com relação a estes animais, é importante ter em mente que a alteração genética utilizada para guiar a transformação maligna pode não ser um modelo representativo do processo de carcinogênese encontrado em tumores humanos<sup>17</sup>. Baixa penetrância da formação tumoral também se traduz em alto custo e consumo de tempo em realizar estudos envolvendo modelos transgênicos<sup>17</sup>.

Sendo assim, produzir em laboratório um modelo de tumor semelhante ao visto em homens não só no tocante à histopatologia, mas também em seus eventos moleculares, fornece material valioso para estudo de agentes de quimioprevenção que venham a interromper ou reverter a carcinogênese da via aerodigestiva superior e que, futuramente, possam ter seu uso extrapolado em seres humanos. Talvez um modelo ideal seja a combinação de uma indução tumoral por carcinógeno em um animal transgênico, quando poderia haver a formação precoce de tumores<sup>17</sup>. Isto seria análogo à exposição crônica ao cigarro e álcool de um indivíduo com pré-disposição genética para o desenvolvimento de CCECP<sup>17</sup>. Ao reproduzir nesses animais os eventos iniciais da carcinogênese visto em tumores humanos, esse modelo permitirá a identificação de biomarcadores preditivos e correlativos e estudar um particular agente de quimioprevenção ou agente terapêutico<sup>17</sup>.

Além das diferentes cepas de animais, o modo de aplicação do 4-NQO, sua dose, tempo de exposição a este e tempo de observação dos animais podem levar à formação de tumores em determinados órgãos da VADS e em períodos distintos de tempo.

Hawkins et al.<sup>21</sup> e Yuan et al.<sup>31</sup> utilizaram método de aplicação tópica do 4-NQO na dose de 5 mg/ml, três vezes por semana por 4 a 16 semanas, observando durante 49 semanas o aparecimento de lesões pré-neoplásicas e carcinoma de células escamosas oral. Zhang et al.<sup>53</sup> utilizaram o método de aplicação tópica na dose de 5 mg/ml, três vezes por semana por 16 semanas. Observaram em um período de até 48 semanas o aparecimento de carcinomas de células escamosas de cavidade oral, esôfago e pré-estômago.

Von Pressentin et al.<sup>52</sup> utilizaram método de administração na água na dose de 20 a 80 µg/ml, com esquemas variados de intervalo e tempo de exposição, observando os animais por 6 semanas. Neste período observaram apenas mutações.

Como citado anteriormente, Tang et al.<sup>33</sup> compararam o método de escovação na dose de 5 mg/ml três vezes por semana, com a administração na água nas doses de 20, 50 e 100 µg/ml de 4-NQO. Ambos os grupos foram submetidos à exposição ao carcinógeno por 8 semanas ou por 16 semanas, sendo observados por mais 16 e 8 semanas, respectivamente, por um período total do experimento de 24 a 28 semanas. Concluíram que o método de aplicação na água além de menos laborioso é o que mais leva à formação de carcinoma de células escamosas oral e carcinoma de células escamosas esofágico. Quanto maiores as doses utilizadas na água e seu tempo de aplicação nos animais, mais rápido, eficaz e mortal é o processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior.

### 1.3 Quimioprevenção: definição, finalidade, formas e histórico em CCECP

Definido por Sporn et al.<sup>55</sup>, o termo quimioprevenção pode ser definido como o uso de agente químico natural ou sintético para reverter, atrasar ou suprimir a progressão da carcinogênese para câncer invasor, ou de prevenir a formação de lesões pré-malignas.

A carcinogênese pré-maligna dos epitélios é um processo biológico de extrema complexidade. Muitos fatores são encontrados como fazendo parte da mesma, como: os múltiplos passos do processo, em decorrência do acúmulo de mutações genéticas

em genes específicos, que produzem um longo período de latência entre a exposição a um dado carcinógeno e o aparecimento clínico da doença; os variados fatores endógenos e exógenos que podem acelerar ou inibir o processo; e a complexidade dos mecanismos celulares, genéticos e bioquímicos que envolvem o processo de carcinogênese<sup>56</sup>. Um completo entendimento destes fatores é de crucial importância para o desenvolvimento dos ensaios de quimioprevenção em humanos<sup>56</sup>.

Evidências sugerem que uma grande fração dos tumores é causada por fatores exógenos. Podem-se citar os carcinógenos químicos como as aminas, nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dentre outros que atuam através da interação de suas moléculas com o DNA produzindo uma mutação permanente (iniciação), seguida da proliferação da célula iniciada e não de sua apoptose, transferindo assim o clone mutado para suas descendentes (promoção) e, finalmente, culminando com a multiplicação descontrolada e de velocidade anormal das células alteradas, que adquirem capacidade de invasão e metastatização (progressão). Logo, a iniciação geralmente é um evento rápido e muitas vezes irreversível e envolve o contato direto do carcinógeno com o DNA e conseqüente dano ao mesmo. A promoção é o período entre a iniciação e a pré-malignidade, sendo reversível e envolvendo mecanismos epigenéticos. A progressão envolve mecanismos genéticos e é o período entre a pré-malignidade e a malignidade, levando à instalação do câncer e conseqüente surgimento de suas primeiras manifestações clínicas. Tanto a promoção como a progressão são eventos de longa duração<sup>56</sup>.

A quimioprevenção é dividida conceitualmente em três: a quimioprevenção primária ou a prevenção inicial do câncer em indivíduos saudáveis, mas de alto risco; a secundária, que é a prevenção do câncer em indivíduos com pré-malignidade

estabelecida; e a terciária, que é a prevenção de segundos tumores primários ou de recorrências em indivíduos com cura presumida de um câncer tratado previamente<sup>57,58</sup>. Assim, a quimioprevenção pode inibir o desenvolvimento de um câncer invasor através do bloqueio do dano ao DNA que inicia a carcinogênese (atuação na fase de iniciação tumoral) ou através da reversão ou supressão da progressão das células pré-malignas nas quais o dano ao DNA ocorreu previamente (atuação nas fases de promoção e progressão tumorais)<sup>59</sup>.

Os principais conceitos biológicos que fomentam o uso da quimioprevenção são o conceito de múltiplos passos e de campo de cancerização.

O de múltiplos passos diz que a carcinogênese ocorre através de uma sequência de eventos pré-malignos que culminam com a neoplasia invasora e que os mesmos poderiam ser revertidos ou suprimidos através de agentes de quimioprevenção. Já o conceito de campo de cancerização afirma que a iniciação e a promoção da carcinogênese ocorrem em uma área ampla a qual requeriria uma intervenção sistêmica ou de amplo campo de atuação para seu controle adequado.

Nestes dois princípios está embasada a essência da carcinogênese<sup>56</sup> e consequente ação de eventuais agentes quimiopreventivos. Tanto o conceito de múltiplos passos (acúmulo de mutações genéticas que levam à progressão da carcinogênese), como o conceito de campo de cancerização (ampla área do trato aerodigestivo superior exposto a ação de um carcinógeno) sustentam o uso de agentes de quimioprevenção em pacientes portadores de lesões orais pré-malignas (quimioprevenção secundária) e em pacientes com história prévia de câncer de cabeça e pescoço que apresentam uma chance de até 7% ao ano de desenvolverem segundos tumores primários (quimioprevenção terciária). Do exposto, reside a

extrema importância em se avançar nas estratégias de quimioprevenção com a descoberta de novas drogas que possam ser utilizadas com este intuito na área de câncer de cabeça e pescoço.

Um agente de quimioprevenção poderia atuar de maneira distinta para fazer cumprir sua função: reversão da diferenciação anormal ao atuar em epitélios displásicos, suprimir a replicação celular (atuando no ciclo celular) ou induzir apoptose em células que normalmente estariam programadas para morrer, mas sofreram mutações que as tornaram imortais<sup>59</sup>. Outra forma de abordagem destes agentes é através da prevenção da ativação metabólica de carcinógenos ou sua subsequente ligação ao DNA (na fase de iniciação). Porém, esta forma de atuação é bastante limitada quando o dano genético já existe, o qual geralmente é um processo irreversível<sup>59</sup>. O uso de agentes com ação antiangiogênica ou de atuação em proteínas responsáveis pelas interações celulares (intraepiteliais e epitélio com estroma), na motilidade celular ou naquelas com ação enzimática digestora da matriz levando à invasão da membrana basal, é motivo de intenso estudo e pode gerar resultados promissores<sup>59</sup>. Além dessas, outras formas de quimioprevenção são citadas na literatura atuando através de efeito antioxidante; de indução enzimática de fases I e II; de imunomodulação; de modulação hormonal; da ação antibacteriana e antiviral; da associação molecular com o carcinógeno; da inibição da formação de adutos de DNA; da modificação da cascata do ácido aracdônico; da inibição do metabolismo das poliaminas; da inibição da síntese de DNA; da inibição da atividade oncogênica; do aumento da comunicação intercelular; da modulação do sinal de transdução intracelular; da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2); da inibição da absorção intestinal, dentre outros<sup>58</sup>.

Os receptores nucleares para retinoides são alvos moleculares adicionais para teste de agentes de quimioprevenção. Existem seis bem definidos receptores de retinoides, todos fatores transcricionais que regulam genes específicos com elementos responsivos específicos<sup>60</sup>, sendo possível sintetizar novos retinoides que são ligantes destes receptores. Retinoides são necessários para a diferenciação apropriada do epitélio da via aerodigestiva superior e a perda da expressão do receptor beta do ácido retinoico (RAR- $\beta$ ) é característica de muitas lesões pré-malignas do epitélio oral<sup>61</sup>. A administração do ácido 13-*cis*-retinoico pode restaurar a expressão de RAR- $\beta$  e, assim, reverter o desenvolvimento das lesões tumorais<sup>61</sup>. Os retinoides X receptores, conhecidos por RXRs, são alvo para o uso de ligantes seletivos. RXRs formam heterodímeros com muitos outros receptores nucleares, incluindo o receptor de vitamina D e um grande grupo de outros receptores nucleares conhecidos como órfãos, para os quais os ligantes não são bem conhecidos<sup>60</sup>.

O mecanismo pelo qual os retinoides suprimem a carcinogênese é complexo<sup>59</sup>. Um grande número de genes envolvidos em diferenciação e proliferação tem elementos responsivos de retinoides<sup>60</sup> e estes desempenham um papel central na regulação de citocinas e da matriz extracelular<sup>62</sup>.

Hong et al.<sup>63,64</sup> conduziram os primeiros estudos randomizados de quimioprevenção com retinoides em câncer de cabeça e pescoço. Tanto em lesões pré-malignas e na prevenção de segundos tumores primários, apesar da toxicidade, altas doses de retinoides pareciam efetivas em atrasar a carcinogênese em ambos os estudos. Entretanto, grandes estudos prospectivos, randomizados, placebo – controle, na tentativa de prevenir segundo tumor primário com baixas doses de retinoides, a

fim de minimizar a toxicidade, falharam em tentar obter os bons resultados dos trabalhos anteriores<sup>65,66</sup>.

É reconhecido que a quimioprevenção por um agente único é limitada por toxicidade e potência<sup>59</sup>. O uso concomitante de diferentes agentes com mecanismos de ação distintos é um campo novo e excitante de investigação<sup>59</sup>. A combinação de promotores de diferenciação com agentes antiproliferativos com indutores da apoptose será apropriada para o tratamento de lesões pré-malignas avançadas<sup>59</sup>.

O uso de bioquimioprevenção mostrou que a combinação do ácido 13-*cis*-retinoico, a-interferon e a-tocoferol parecia ser a próxima fronteira para pacientes de alto risco para CCECP<sup>67</sup>. Um estudo publicado por Shin et al.<sup>68</sup> mostrou que 80% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço avançado (estádios III e IV) completaram um ano de tratamento deste regime intenso de bioquimioprevenção, tendo sido projetada uma sobrevida livre de doença em 5 anos de 80%. Infelizmente, a combinação de retinoides em dose intermediária (13-cRA) com a-tocoferol e a-interferon, que parecia promissora em atrasar a recorrência da doença em pacientes com câncer de cabeça e pescoço avançado, mostrou-se pouco prática devido à grande recusa de pacientes em serem colocados randomicamente em um braço que envolvia tratamento agressivo com múltiplas drogas, ao invés de serem colocados no braço placebo, o que levou ao abandono precoce do estudo<sup>68</sup>.

Nos sete anos seguintes a este estudo, muito foi publicado na literatura em relação à quimioprevenção com retinoides em câncer de cabeça e pescoço<sup>67</sup>. Conclusões negativas do estudo fase III de Khuri et al.<sup>66</sup> do uso de retinoides como quimioprevenção terciária em pacientes tratados previamente por câncer de cabeça e pescoço estádios I e II foram publicadas.



Com o avanço nas áreas de biologia molecular e celular da carcinogênese, alvos específicos para intervenção preventiva estão sendo identificados e novos agentes de quimioprevenção estão sendo sintetizados e testados<sup>59</sup>. Neste ponto, o futuro desenvolvimento de marcadores moleculares prognósticos, baseando nisto a seleção de agentes de quimioprevenção, volta novamente a ganhar atenção da comunidade científica<sup>67</sup>.

Kawaguchi et al.<sup>69</sup> identificaram a podoplanina, um marcador endotelial linfático, que, quando presente e combinado a dados histopatológicos do tumor, antecipa um risco de transformação maligna aumentado para as lesões leucoplásicas orais. Logo, desenvolver um agente que atue nas lesões com este marcador seria o próximo passo.

Assim, caminha-se para uma nova estratégia de quimioprevenção: a de risco estratificado<sup>67</sup>. Esta somente evoluirá com a identificação de biomarcadores reproduzíveis e de credibilidade envolvidos na progressão da carcinogênese e se os novos agentes promissores que atuam, baseados nestes biomarcadores, possam ser trazidos para a prática clínica com a intenção de suprimir, reverter ou prevenir a progressão da carcinogênese em câncer invasor<sup>67</sup>. Estes novos agentes estão em estudo ou em desenvolvimento<sup>67</sup>. Apenas quando estes biomarcadores estiverem validados em pesquisas prospectivas randomizadas e o seu uso incorporado nos modelos estratificados por risco molecular, estar-se-á cumprindo a promessa original de quimioprevenção efetiva em câncer de cabeça e pescoço<sup>67</sup>.

#### 1.4 Quimioprevenção em CCECP: novos compostos em estudo em modelos animais

Diversos compostos foram testados ao longo dos anos que antecederam e sucederam a era do início dos estudos com quimioprevenção iniciada pelos retinoides na área de câncer de cabeça e pescoço.

Ao longo dos últimos trinta anos, quando estudos para determinar efeitos de agentes de quimioprevenção *in vivo* foram iniciados, mais de 100 pesquisas foram relatadas por diversos pesquisadores<sup>58</sup>. Flavonoides, isoflavonoides, carotenoides, compostos organosulfúricos, vitaminas, selênio, ácidos graxos poliinsaturados, curcumina e derivados, limonoides, clorofilina, lactoferrina, dentre outros, foram citados e muitos testados, com finalidade quimiopreventiva, em diversas neoplasias, dentre elas em CCECP.

Um dos preceitos básicos da quimioprevenção é a necessidade de uso crônico dos agentes quimiopreventivos, pois uma vez interrompidos, um espaço é aberto para a reativação da carcinogênese, o que muitas vezes leva a uma toxicidade inaceitável.

Pesquisadores diversos tentaram encontrar uma substância que fosse efetiva na quimioprevenção, mas que também fosse de preferência natural, acessível, econômica e menos tóxica que os retinoides, visto que estes quando aplicados cronicamente em doses que induzissem uma resposta eficaz eram acompanhados de extrema toxicidade, o que levava à interrupção dos estudos ou desistência por parte dos pacientes.

Assim, compostos como o  $\beta$ -caroteno foram testados por autores como Garewal et al.<sup>70</sup>, que, ao utilizarem esta substância, encontraram uma resposta efetiva do controle das lesões leucoplásicas orais com excelente tolerabilidade. Em

contrapartida, Mayne et al.<sup>71</sup> não tiveram os mesmos resultados, encontrando em seus pacientes uma possível redução no risco de segundos tumores primários de cabeça e pescoço, porém não estatisticamente significante, e um possível aumento no risco de câncer de pulmão em pacientes tabagistas.

Vários novos agentes de quimioprevenção têm sido testados em protocolos clínicos de quimioprevenção em câncer de cabeça e pescoço. Estes incluem análogos da curcumina, extratos de chá verde, selênio, polifenóis do suco de pomegranato, derivados da soja, dentre outros<sup>67</sup>.

Os agentes de quimioprevenção podem alterar ou reverter a expressão ou a função de alvos moleculares responsáveis pela transformação de células normais ou controlando a proliferação de células transformadas. Dependendo do agente de quimioprevenção, ele poderá bloquear ou suprimir o processo de carcinogênese<sup>58</sup>. Os bloqueadores como a curcumina e flavonoides inibem o metabolismo do carcinógeno ou previnem a fase de iniciação da carcinogênese por impedirem que os metabólitos dos carcinógenos liguem-se a alvos específicos. O grupo dos supressores previne ou interrompe a carcinogênese em células que poderiam levar a formação de um tumor; podendo atuar como indutores da apoptose (retinoides), como moduladores hormonais (anti-inflamatórios não esteroidais) e como moduladores do sinal de transdução (ácido glicirrenítico). Há uma terceira categoria conhecida como inibidores da formação de carcinógenos, como é o caso do ácido ferúlico e de determinados chás que interferem com a formação de compostos altamente carcinogênicos como as nitrosaminas<sup>58</sup>.

Na população saudável em geral, a prevenção da atuação do carcinógeno seria a escolha (quimioprevenção primária), assim o uso de agentes bloqueadores seria a

prioridade. No grupo de alto risco, quando a prevenção da progressão do processo neoplásico é o objetivo principal (quimioprevenções secundária e terciária), o indicado seria o uso de agentes de supressão<sup>58</sup>. É importante citar que muitos agentes apresentam múltiplos mecanismos de ação, não podendo ser alocados em nenhuma categoria específica.

Uma vez criado, em animais de laboratório, o modelo de carcinogênese da via aerodigestiva superior, paralela ao que é visto em tumores humanos, como aquela desencadeada pelo uso de 4-NQO, agentes de quimioprevenção podem ser testados e os resultados positivos e negativos, até mesmo extrapolados para o ser humano, com certo critério.

Claramente existem falhas e limitações nestes modelos, já que muitas vezes uma determinada droga tem resultado positivo em animais, mas uma dose equivalente quando aplicada em seres humanos é inaceitável do ponto de vista de toxicidade, custo, quantidade ou até eficácia. Vários fatores necessitam ser levados em conta, como atuação do sistema imune, expectativa de vida dos animais, relação de custo *vs* benefício quando transferidos para humanos, biodisponibilidade da substância, formas de administração na população, acessibilidade, efeitos colaterais, entre outros. Além de fatores ligados aos tumores, como similaridade histopatológica com a forma de apresentação tumoral em humanos e aspectos celulares e moleculares semelhantes aos vistos na carcinogênese humana.

Independente do exposto, o estudo da ação de agentes de quimioprevenção em animais de laboratório não deixa de ter extrema importância e seus resultados podem sim, com devido critério, serem cogitados como também presentes em humanos. Para isto, o uso de drogas, muitas delas naturais e facilmente disponíveis, em

tumores que apresentam um processo de carcinogênese semelhante ao induzido por carcinógenos conhecidos, como o tabaco, e em animais que apresentam um campo genético predisposto (animais transgênicos) e semelhante aos eventos moleculares vistos na carcinogênese de CCECP de humanos, fará com que se possa atingir um modelo de quimioprevenção efetivo em indivíduos de risco de formas secundária e terciária e, quem sabe, também, em populações de alto risco de maneira primária.

Muitos estudos testando agentes de quimioprevenção em camundongos e ratos submetidos à exposição com 4NQO são encontrados na literatura. O uso destes agentes foi realizado de maneira secundária, ou seja, após a fase de iniciação tumoral desencadeada pelo 4-NQO ou de maneira primária, quando o uso do agente de quimioprevenção se iniciou precocemente, já na fase de exposição ao carcinógeno em questão.

Na literatura, Tanaka et al.<sup>72-77</sup> com frequência testam diferentes agentes, muitos deles naturais, em animais expostos ao 4-NQO ou a outros agentes carcinogênicos conhecidos. Trabalhos mostrando o uso de substâncias diversas, como o ácido protocatecúico testado nas fases de iniciação e pós-iniciação<sup>72</sup>; curcumina, hesperidina e  $\beta$ -caroteno também testados na iniciação e na pós-iniciação<sup>73</sup>; flavonoides diosmina e hesperidina sozinhos ou em combinação em diferentes fases da carcinogênese<sup>74</sup>; selênio nas fases de iniciação e pós-iniciação<sup>75</sup>; *Citrus auraptano* durante as diferentes fases da carcinogênese<sup>76</sup>; e capsaicina e rotenone também nas mesmas fases já descritas<sup>77</sup>, foram publicados em CCECP.

O ácido protocatecúico<sup>72</sup> inibiu a carcinogênese oral nas fases de iniciação e pós-iniciação, a qual pode estar relacionada com a supressão da proliferação celular. Já o uso de curcumina e  $\beta$ -caroteno, durante as fases de iniciação e pós-iniciação e de

hesperidina na fase de iniciação<sup>73</sup>, causou uma redução significativa na frequência de CCE de língua e das lesões pré-malignas, sendo esta ação quimiopreventiva maior para a curcumina, provavelmente relacionada à supressão da proliferação celular. A suplementação com flavonoides diosmina e hesperidina<sup>74</sup>, individualmente ou em combinação, nas fases de iniciação e pós-iniciação, levou a uma diminuição na incidência de lesões pré-malignas e de CCE de língua, também por suprimir o aumento da proliferação celular causado pelo 4-NQO na mucosa oral. O fornecimento de selênio<sup>75</sup> nas fases de iniciação e, principalmente, na de pós-iniciação, reduziu a incidência de CCE de língua, provavelmente, por atuar na proliferação celular. O mesmo foi verificado com a administração de *Citrus auraptano*<sup>76</sup> nas fases de iniciação e pós-iniciação: um decréscimo na incidência de CCE de língua e de displasia severa, pela atuação em enzimas de fase II e pela supressão da proliferação celular. Não diferente, o uso de rotenone<sup>77</sup> durante a fase de iniciação reduziu com significância estatística a incidência de CCE de língua e de displasia severa; já o uso de capsaicina nas fases de iniciação e promoção e de rotenone na fase de promoção<sup>77</sup> também reduziu a incidência de CCE de língua, porém sem significância estatística. Os dois compostos, especialmente o rotenone, reduziram o índice de proliferação celular na língua, elevaram a atividade das enzimas de fase II no fígado e na língua, além de terem aumentado o índice apoptótico no CCE de língua.

Yanaida et al.<sup>78</sup> utilizaram silimarina – um antioxidante flavonoide polifenólico – durante a indução da carcinogênese com 4-NQO e após a mesma. Concluíram que silimarina na dose de 500 ppm durante a fase de promoção exerce habilidade quimiopreventiva contra carcinoma de células escamosas de língua através da

modificação da atividade das enzimas de fase II, decréscimo na proliferação celular, aumento do índice apoptótico no CCE de língua e diminuição do nível de prostaglandina E2 e do conteúdo de poliamina na mucosa lingual.

Hasina et al.<sup>14</sup> testaram uma droga com ação antiangiogênica – ABT-510 – em animais submetidos previamente à indução tumoral com 4-NQO e observaram uma diminuição na incidência de carcinoma de células escamosas oral, assim como na incidência combinada de displasia e carcinoma de células escamosas. Aumento na densidade da microcirculação e do fator de crescimento endotelial vascular nas lesões hiperqueratóticas fornece evidência de que o início do fenótipo angiogênico ocorre antes do desenvolvimento das displasias, o que justifica a hipótese de inibidores da angiogênese poderem ser promissores como agentes quimiopreventivos neste modelo de indução de CCECP.

Czerninski et al.<sup>44</sup> ao fornecerem rapamicina a camundongos expostos previamente à indução tumoral com 4-NQO por 16 semanas causaram uma interrupção da transformação maligna das lesões pré-neoplásicas e promoveram a regressão de carcinoma de células escamosas avançado. Juntos, estes achados suportam a contribuição da via de sinalização *mTOR* no modelo de carcinogênese de CCECP e a eventual avaliação do uso de inibidores de *mTOR* como estratégia molecular para tratamento e quimioprevenção de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.

Makita et al.<sup>79</sup> descreveram que os flavonoides calcone, 2-hidroxicalcone e quercetina, fornecidos durante as fases de iniciação e pós-iniciação da carcinogênese, efetivamente suprimiram a atividade carcinogênica do 4-NQO e este efeito deveu-se em parte à supressão da proliferação celular.

Neste estudo, o uso de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFAS ômega-3), também conhecido como óleo de peixe (OP), e do ligante do PPAR- $\gamma$  - *peroxisome proliferator activated receptor* - (pioglitazone), nas fases de iniciação e promoção tumorais, promovidos pelo uso de 4-NQO em camundongos Swiss, foram testados.

### 1.5 PUFAS ômega-3: forma de atuação como agente quimiopreventivo e seu uso em animais de laboratório

Gorduras saturadas estão implicadas na etiologia de diversos tipos de tumor. Porém, evidências de ação antitumoral dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFAS ômega-3), como o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), são vastamente expostas na literatura<sup>80-82</sup>. A atividade antitumoral foi demonstrada em roedores através da suplementação de EPA e DHA (5% a 20%) nos casos de câncer de mama<sup>83,84</sup>, próstata<sup>85</sup>, fígado<sup>86</sup> e pâncreas<sup>87</sup>. Trabalhos em culturas de células tumorais humanas mostram que PUFAS ômega-3 podem reduzir o crescimento de diferentes tipos de tumor humano como em mama<sup>83</sup>, cólon<sup>88</sup> e pâncreas<sup>89</sup>.

Neste momento, apesar do exposto na literatura, existe evidência insuficiente de estudos epidemiológicos em humanos de que as propriedades antitumorais de PUFAS ômega-3, demonstradas em muitos estudos com animais e com cultura celular, possam ser reproduzidas com eficiência em seres humanos portadores de neoplasias malignas ou de alto risco para o desenvolvimento delas<sup>90</sup>.



Ácidos graxos são cadeias de hidrogênio e carbono associadas com um grupo carboxil em uma extremidade e um grupo metil em outra<sup>91</sup>. O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre os carbonos (simples ou dupla) originam os diversos tipos de ácidos graxos<sup>91</sup>. As ligações entre todos os carbonos nos ácidos graxos saturados são ligações simples e totalmente saturadas com hidrogênio<sup>91</sup>. Ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (PUFAS) têm ligações que não estão saturadas com hidrogênio e uma ou mais ligações duplas conectam os carbonos<sup>91</sup>. Seres humanos podem sintetizar ácidos graxos saturados e monoinsaturados, mas não os poliinsaturados<sup>91</sup>.

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) são subdivididos em derivados do ácido linoleico – ômega 6 e do ácido  $\alpha$ -linolênico – ômega 3. São componentes essenciais de fosfolípídeos da membrana celular e substratos para várias enzimas, sendo considerados ácidos graxos essenciais, devendo ser obtidos na dieta<sup>91</sup>.

PUFAS ômega-6 são consumidos primariamente como ácido linoleico, encontrado em óleos vegetais, mas o ácido aracdônico (AA) é também obtido de carnes<sup>92</sup>. PUFAS ômega-3 são consumidos como ácido  $\alpha$ -linolênico, sendo encontrados em quantidades variáveis de alguns óleos, como de canola, e em vegetais escuros-folhas<sup>91</sup>. PUFAS de cadeia longa, principalmente EPA e DHA, são encontrados em alguns peixes de água fria e em óleo de peixe (op)<sup>91</sup>.

Uma das funções mais importantes de PUFAS está relacionada com sua conversão enzimática em eicosanoides, os quais são lipídeos que apresentam uma ação hormonal – *like*<sup>93</sup>. Eicosanoides são substâncias biologicamente potentes e apresentam uma grande variedade de atividades: modulam as respostas inflamatória e imune e apresentam importante papel na agregação plaquetária, crescimento e

diferenciação celulares<sup>93</sup>. A formação de eicosanoides através de PUFAS depende da ação das ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX).

COX e LOX atuam nos ácidos graxos para produzirem eicosanoides – moléculas de sinalização celular<sup>91</sup>. Ciclooxigenases apresentam duas isoenzimas: COX-1 e COX-2<sup>91</sup>. A COX-1 é constitutiva, produzida pela grande maioria das células, enquanto que a COX-2 é induzida, sendo produzida como parte da resposta inflamatória e expressa em resposta a fatores de crescimento, citocinas e promotores tumorais<sup>91,93</sup>. As ciclooxigenases ao atuarem no AA e EPA originam prostaglandinas e tromboxanes, enquanto que as lipooxigenases ao atuarem nos mesmos substratos originam leucotrienos e lipoxinas<sup>91,93</sup>. As prostaglandinas e tromboxanes da série 2 e leucotrienos da série 4, provenientes do ácido aracdônico, tendem a ser mais pró-inflamatórias e pró-proliferativas na maioria dos tecidos, enquanto que as prostaglandinas e tromboxanes da série 3 e leucotrienos da série 5 provenientes de EPA são menos promocionais para inflamação e proliferação<sup>91,93</sup>. Assim, os eicosanoides derivados de EPA são menos favoráveis para o desenvolvimento e crescimento de células tumorais<sup>91</sup>. A incorporação de PUFAS ômega-3 suprime a produção de COX-2<sup>94,95</sup> e reduz a resposta inflamatória por mudarem os tipos de eicosanoides produzidos<sup>91</sup>. Pelo fato de a inflamação estar associada com promoção tumoral, o uso de inibidores COX-2 para reduzir a inflamação tem se mostrado promissor como estratégia antitumoral<sup>96-103</sup>.

Sabe-se que PUFAS ômega-3 (EPA e DHA) competem pelas mesmas ciclooxigenases e lipooxigenases que o ácido aracdônico<sup>93</sup>, além de, como visto, suprimirem a atividade COX-2<sup>104</sup>. Ao ocuparem os receptores que seriam do ácido aracdônico, derivam a biossíntese de eicosanoides, o que resulta na alteração da

resposta imune às células tumorais, na proliferação celular, na diferenciação celular, apoptose e angiogênese<sup>93</sup>. Assim, a supressão da produção de ácido aracdônico por PUFAS ômega-3 também suprime a produção de eicosanoides derivados do ácido aracdônico<sup>91</sup>.

O principal mecanismo pelo qual PUFAS ômega-3 diminuiriam o risco de câncer seria através da supressão da biossíntese de eicosanoides derivados do ácido aracdônico. PUFAS ômega-3, estando presentes e disponíveis, serão utilizados como substrato por COX e LOX<sup>91,93</sup>. Aumento do consumo de ômega-3 resultaria em sua incorporação na membrana fosfolipídica, onde parcialmente substituiriam o AA<sup>93</sup>.

A produção de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanes e leucotrienos) começa com a liberação de PUFAS da membrana fosfolipídica através da ação das fosfolipases<sup>93</sup>. PUFAS ômega-6, derivados do ácido linoleico, são precursores do ácido aracdônico e PUFAS ômega-3, derivados do ácido  $\alpha$ -linolênico são precursores de EPA e DHA<sup>93</sup>. AA, EPA e DHA servirão como substrato para cicloxigenases 1 e 2 e lipoxigenases para produção de eicosanoides<sup>93</sup>. Como é maior a concentração de ácido aracdônico na membrana celular do que de EPA e DHA, a maior parte das prostaglandinas e tromboxanes produzidas são da série 2 e leucotrienos são da série 4<sup>93</sup>. Estudos apontam para a promoção tumoral através da inibição da apoptose, estimulação da proliferação celular e aumento da angiogênese tumoral causada pelos eicosanoides derivados do ácido aracdônico, como a prostaglandina E2<sup>93</sup>. Leucotrieno-4 parece ter atuação na adesão da célula tumoral (metastatização)<sup>105</sup> e na formação de espécies reativas de oxigênio, o que resultaria em dano ao DNA (iniciação tumoral)<sup>106</sup>.

Com a diminuição da oferta de AA, haveria uma supressão da biossíntese de eicosanoides via AA em favor de eicosanoides via EPA, produzindo prostaglandinas e tromboxanes da série 3 e leucotrienos da série 5<sup>93</sup>. Como EPA é um melhor substrato para COX do que o AA e como PUFAS ômega-3 apresentam maior afinidade enzimática que PUFAS ômega-6, ou seja, PUFAS ômega-3 apresentam maior sucesso ao competirem com AA pela atividade COX, um acréscimo de ômega-3 na dieta reduziria a desaturação e a elongação do ácido linoleico em AA e, conseqüentemente, diminuiria a produção de eicosanoides via AA<sup>93,107</sup>. Em acréscimo, as lipoxigenases preferem ter como substrato EPA do que AA; basta aquela estar mais disponível<sup>93</sup>. É importante citar que a produção de eicosanoides via ácido aracdônico é diminuída não apenas por PUFAS ômega-3, mas também pelos eicosanoides produzidos por estas<sup>93</sup>.

Levando em consideração estes fatores, uma redução dramática dos níveis de eicosanoides derivados do AA poderia ocorrer através de um aumento de oferta na dieta de PUFAS ômega-3, o que acarretariam efeitos anti-inflamatórios e antitumorais<sup>91,93</sup>.

Muitos estudos experimentais demonstram que uma modificação nos padrões alimentares do mundo ocidental interfere no desenvolvimento de processos inflamatórios e na proliferação e diferenciação celulares<sup>90</sup>. PUFAS ômega-3 interferem no sistema imunológico levando a uma menor incidência de processo inflamatório e doenças autoimunes<sup>90</sup>. Acredita-se que o mecanismo pelo qual PUFAS ômega-3 atue no sistema imune seja diminuindo a produção de certas interleucinas, alterando a atividade de células citotóxicas, bem como atuando na produção de anticorpos, proliferação de linfócitos e na expressão das moléculas de

adesão<sup>90</sup>. Além disso, aumentam a apoptose através do incremento da atividade citotóxica e da peroxidação dos lipídios de membrana<sup>90</sup>.

Evidências consideráveis demonstram que PUFAS ômega-3 inibem os estágios de iniciação e promoção da carcinogênese, assim como existe alguma evidência de que possa influenciar a progressão tumoral<sup>93,108</sup>. Ao suprimirem a produção de eicosanoides, via ácido aracdônico, PUFAS ômega-3 levariam a uma alteração da resposta imune às células tumorais e modulação da inflamação, do crescimento celular tumoral, da diferenciação celular, da angiogênese, da apoptose e da metastatização<sup>93</sup>. Além destes mecanismos, influência na ativação de fatores de transcrição (como os *peroxisome proliferator activated receptors* – PPARs), na expressão gênica e na transdução de sinal, que levariam a mudanças no metabolismo, crescimento celular e diferenciação são também relatados<sup>93</sup>. Outras ações de PUFAS ômega-3, como alteração na produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, sensitização insulínica, fluidibilidade de membrana e alteração no metabolismo do estrogênio, são também ligadas à sua ação antitumoral<sup>93</sup>.

Ácido aracdônico promove o crescimento celular por ativar a proteína quinase C, a qual estimula a mitose; o que não é feito por PUFAS ômega-3<sup>109</sup>. PUFAS ômega-3 diminuem a ativação do oncogene *ras*, o qual está relacionado com o estímulo à proliferação celular.

O fator de transcrição nuclear  $\kappa$ - $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) está envolvido em expressão gênica de citocinas, adesão celular, ativação do ciclo celular e apoptose<sup>109</sup>. Quando ativado, NF $\kappa$  $\beta$  bloqueia a apoptose por ativar a família de genes Bcl-2 e a expressão de COX-2. PUFAS ômega-3 podem restaurar a apoptose ao inibir NF $\kappa$  $\beta$ <sup>109</sup> e, por consequência, a expressão de COX-2<sup>110,111</sup> e a de genes da família Bcl-2<sup>112,113</sup>.

Existem fortes evidências de que a diminuição na produção de prostaglandinas e a inibição da proteína quinase – C<sup>110</sup> sejam um caminho através do qual PUFAS ômega-3 inibam a angiogênese tumoral.

Superexpressão de COX-2 tem sido detectada em muitos tipos de tumor e a mesma tem sido implicada na inibição da apoptose<sup>81</sup>. Como visto anteriormente, PUFAS ômega-3 desempenha uma de suas ações antitumorais por suprimir a expressão de COX-2<sup>93</sup>. Numerosos estudos epidemiológicos descobriram que o uso prolongado de inibidores COX-2 está associado com menor risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer<sup>114</sup>. COX-2 catalisa a conversão de pró-carcinógenos em carcinógenos e a metabolização do ácido aracônico, que em parte depende de COX-2, é suficiente para produzir mutagênicos<sup>115</sup>.

Além disso, a superexpressão de COX-2 contribui em outros aspectos da carcinogênese, como promoção da proliferação celular, indução da angiogênese e propensão à invasão tumoral<sup>103</sup>, principalmente devido ao aumento da produção de prostaglandina E2<sup>102</sup>, cuja formação é minimizada quando PUFAS ômega – 3 estão disponíveis como substrato para produção de eicosanoides.

Prostaglandinas ligam-se aos receptores de proteína G das superfícies celulares, os quais ativam a cascata de transdução de sinal intracelular de diferentes formas<sup>116</sup>. Alternativamente, algumas prostaglandinas da série 2 podem se ligar ao fator de transcrição nuclear PPAR, o qual regula a expressão de uma série de genes envolvidos com a proliferação celular<sup>117</sup>. Prostaglandina E2 pode estimular a proliferação e a motilidade celulares, bem como inibir o sistema imune e apoptose, além de induzir angiogênese<sup>102</sup>. Estimulação de  $\beta$ -catenina e aumento da expressão de ciclina D1 e *c-myc* têm sido atribuídos à prostaglandina E2 em estudos *in vitro*<sup>118</sup>.

Óxido nítrico, radicais livres e espécies reativas de oxigênio, cujas produções estão aumentadas nos processos inflamatórios, são mutagênicos, podendo causar danos às bases de DNA e à sua reparação, o que a longo prazo podem levar à formação de um câncer<sup>119</sup>. Estudos têm mostrado efeitos supressores de PUFAS ômega-3 na produção de óxido nítrico<sup>120</sup>.

Inexiste na literatura publicação que correlacione a atuação quimiopreventiva de PUFAS ômega-3 em carcinogênese da cavidade oral e esôfago, induzida ou não por uma série de carcinógenos como o 4-NQO, em animais de laboratório.

#### 1.6 Agonista PPAR-?: forma de atuação como agente quimiopreventivo ou potencial agente pró-tumoral e seu uso em animais de laboratório

*Peroxisome proliferator activated receptors* (PPARs) são membros da superfamília dos receptores nucleares, que incluem receptores para esteroides, hormônio tireoidiano, vitamina D ou ácido retinoico<sup>121</sup>.

Até o momento, diversos PPARs, incluindo PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  e PPAR-?, foram identificados<sup>122</sup>. Os três subtipos de PPARs ligam-se a determinados ácidos graxos e seus metabólitos e regulam a expressão dos genes envolvidos no transporte e metabolismo dos mesmos para as células<sup>123</sup>.

PPAR- $\alpha$  regula o catabolismo de ácidos graxos e está altamente expresso em hepatócitos, cardiomiócitos, enterócitos e células do túbulo contornado proximal renal; PPAR- $\beta$  ou  $\delta$  está ligado ao desenvolvimento, implantação embrionária, mielinização do corpo caloso, proliferação de células epidérmicas; PPAR-? controla

diferenciação adipocitária, homeostase glicêmica e lipídica e está altamente expresso no tecido adiposo e sistema imunológico<sup>117,122</sup>. O mais estudado das isoformas de PPARs é o PPAR- $\gamma$ <sup>124</sup>.

Estudos têm demonstrado que este receptor também participa de caminhos outros de interesse biológico e clínico, como o câncer<sup>124</sup>. A atividade de PPAR- $\gamma$  em inibir a proliferação de fibroblastos durante a diferenciação adipocitária foi o que primeiramente sugeriu que este receptor fosse capaz de atenuar um comportamento maligno<sup>124</sup>. Isto foi inicialmente comprovado em lipossarcomas, que comumente expressam altos níveis de PPAR- $\gamma$ <sup>125</sup>. A administração de tiazolidinedionas em pacientes com lipossarcomas mostrou que a ativação de PPAR- $\gamma$  causou sinais de diferenciação adipocitária e interrupção do crescimento tumoral<sup>125</sup>.

A mucosa colônica expressa altos níveis de PPAR- $\gamma$  e o uso de ligantes sintéticos do mesmo reduz o crescimento celular e induz diferenciação em linhagens celulares de câncer de cólon humano em pesquisas feitas *in vitro* e *in vivo*<sup>126</sup>.

Os PPARs são conhecidos ligantes ativados de fatores transcricionais, que controlam a expressão gênica, por se ligarem a elementos responsivos específicos do DNA (PPREs), como um complexo heterodimérico com retinoide / receptor alfa – RXR- $\alpha$ <sup>60</sup>. Sua ligação com o complexo heterodimérico PPARs + RXR- $\alpha$  ativa os PPREs do DNA, levando à transcrição de genes relacionados com indução enzimática, proliferação de peroxissomos, metabolismo lipídico, proliferação celular, diferenciação celular e ação pró-apoptótica<sup>127</sup>.

A ligação simultânea de RXR- $\alpha$  com seu ligante resulta em potencialização da atividade transcricional<sup>128</sup>. O heterodímero ativado PPAR- $\gamma$  / RXR- $\alpha$  liga-se aos PPREs de um gene alvo e proteínas coativadoras são recrutadas para modular a



transcrição gênica<sup>60</sup>. Diferentes ligantes de PPAR- $\gamma$  parecem ser capazes de recrutar diferentes coativadores, o que pode prover especificidade de atividade biológica para o PPAR- $\gamma$ <sup>129</sup>. Nem todos os ligantes necessitam de coativadores. Via de regra, os ligantes naturais, mas não os sintéticos, necessitam destas proteínas, o que pode explicar em parte a maior afinidade e poder de atuação que as tiazolidinedionas (ligantes sintéticos de PPAR- $\gamma$ ) têm com PPAR- $\gamma$ , se comparadas com ligantes naturais de PPAR- $\gamma$  como a prostaglandina J2 e PUFAS ômega-3<sup>130</sup>.

Tecido adiposo tem um dos mais altos níveis de PPAR- $\gamma$ <sup>127</sup>. Entretanto, o receptor é expresso nos mais variados tecidos e células do corpo, incluindo cólon, pneumócitos tipo 2, macrófagos, músculo esquelético, dentre outros<sup>127</sup>. Existem duas isoformas de PPAR- $\gamma$ : 1 e 2<sup>127</sup>. A maioria dos tecidos expressa a isoforma 1, enquanto que a 2 é específica dos adipócitos<sup>127</sup>. Células tumorais provavelmente expressam uma quantidade equivalente ou não de PPAR- $\gamma$  àquela encontrada em células normais<sup>127</sup>.

PPAR- $\gamma$  mostrou inicialmente ter ação regulatória na sensitização da insulina, estando relacionado diretamente com diversos processos biológicos, incluindo a adipogênese, o metabolismo da glicose e a homeostase lipídica<sup>131</sup>. O incremento da sensitização insulínica ocorre pelo aumento da transcrição de certos genes envolvidos com o metabolismo e transporte de gordura dos adipócitos, como a lipase lipoproteica<sup>127</sup>. Em adição ao exposto, promovem a diferenciação dos pré-adipócitos por mimetizarem certos efeitos genômicos da insulina nos adipócitos<sup>132</sup> e por regularem a homeostase da glicose<sup>121</sup>. Assim, ligantes sintéticos do PPAR- $\gamma$  (agonistas), conhecidos como tiazolidinedionas, são utilizados no manejo de pacientes portadores de diabetes mellitus não dependentes de insulina, por reduzirem

a resistência insulínica e auxiliarem no controle glicêmico<sup>133</sup>. Estes ligantes sintéticos são conhecidos no mercado como troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone e ciglitazone<sup>133</sup>.

Outros ligantes dos PPARs também conhecidos como PPS são: fibratos, herbicidas, AAS, antagonistas de leucotrienos, ácidos perfluorinados, prostaglandinas (15-PGJ<sub>2</sub>), leucotrienos, anti-inflamatórios não esteroidais e ácidos graxos poliinsaturados<sup>127,134</sup>. Observou-se, em modelos animais, que as tiazolidinedionas apresentam uma afinidade maior de ligação com os PPARs do que ligantes endógenos naturais como ácidos graxos, prostaglandinas e leucotrienos.

Suh et al.<sup>135</sup> relataram menor incidência de câncer em animais de laboratório com o uso de PUFAS ômega-3, por sugerirem a ligação dos mesmos com os PPARs.

A ativação de receptores nucleares, como os PPARs, tem sido estudada como uma maneira de induzir diferenciação celular e de inibir a proliferação de células tumorais<sup>127</sup>. Um dos grandes exemplos é o estudo do uso do ácido *all-trans*-retinoico para induzir a diferenciação de células tumorais tireoidianas indiferenciadas no tratamento do câncer de tireoide e para prevenção de recorrências em câncer de cabeça e pescoço<sup>127</sup>.

Perda de função do gene PPAR-? em decorrência de mutações somáticas é encontrada em câncer de cólon de humanos, sugerindo que PPAR-? possa funcionar diretamente como gene supressor de tumor<sup>122</sup>. Assim, sugere-se que a ativação de PPAR-? tenha um potencial quimiopreventivo<sup>122</sup>.

O receptor está expresso em células de câncer de mama de humanos e em tumores de mama; tiazolidinedionas inibem o crescimento destas células *in vitro* e *in vivo*, induzindo diferenciação em alguns casos<sup>136</sup>.

Adicionalmente, uma parcela de tumores prostáticos de humanos apresenta deleção do gene PPAR- $\gamma$ ; 20% de pacientes com câncer de próstata, tratados com troglitazone tiveram um decréscimo dos níveis de antígeno prostático específico e 39% apresentaram estabilização prolongada<sup>137</sup>.

A fusão da oncoproteína PAX8-PPAR- $\gamma$  suprime a função de PPAR- $\gamma$ , o que parece ser um dos fatores implicados na gênese do carcinoma folicular de tireoide<sup>138</sup>.

Lu et al.<sup>139</sup> observaram que camundongos com expressão tipo selvagem de PPAR- $\gamma$  (+/+) tinham menor suscetibilidade de desenvolver câncer gástrico (adenocarcinoma) induzido pelo carcinógeno *N*-metil-*N*-nitrosurea do que os com deficiência heterozigótica de PPAR- $\gamma$  (+/-), também sugerindo que PPAR- $\gamma$  possa funcionar como um gene supressor de tumor. Quando ambos os grupos eram tratados com troglitazone, a incidência de câncer gástrico reduziu em camundongos (+/+) e permaneceu inalterada nos (+/-), o que sugere uma ação quimiopreventiva deste agonista, que atua por uma via dependente de PPAR- $\gamma$ .

Pesquisas em cultura de células tumorais humanas indicaram que tanto os ligantes naturais como os ligantes sintéticos do PPAR- $\gamma$  estimulam a diferenciação celular e inibem o crescimento celular em diversos tipos de neoplasias, como pulmão, mama, tireoide, próstata, cólon, pâncreas, bexiga e cabeça e pescoço<sup>140-147</sup>. Estudos em roedores reportam que os ligantes de PPAR- $\gamma$  inibem crescimento de tumor mamário<sup>135</sup> e que os ligantes de PPAR- $\gamma$  e PPAR- $\alpha$  reduzem a proliferação celular na mucosa colônica após exposição a carcinógenos endógenos<sup>148</sup>.

Terapia de alvo molecular é um tratamento baseado em alvos moleculares e proteínas que são seletivamente expressas pelas células tumorais<sup>130</sup>. Isto inclui fatores de crescimento e seus receptores, oncogenes, hormônios, moléculas

relacionadas à apoptose, fatores relacionados à angiogênese, assim como inibidores da motilidade celular, invasão e proteólise<sup>130</sup>. Hamakawa et al.<sup>130</sup> revisaram a terapêutica baseada em alvos moleculares, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), COX-2 e PPAR- $\gamma$ , e ofereceram vários exemplos de como atuar nestes alvos moleculares, podendo ser promissor em pacientes portadores de carcinoma de células escamosas oral. Apesar de não terem encontrado mutação de PPAR- $\gamma$  em alguns tumores, perda da expressão e função de PPAR- $\gamma$  estão associadas com a progressão tumoral do carcinoma de células escamosas oral<sup>130</sup>. Acredita-se que a ação dos ligantes de PPAR- $\gamma$ , nas situações em que PPAR- $\gamma$  está pouco expresso, ocorra em boa parte por uma via independente da PPAR- $\gamma$ <sup>146</sup>.

Harris et al.<sup>149</sup>, ao estudarem a ação de um derivado sintético de retinoide, o qual é um ativador funcional de PPARs, em células de CCECP, encontraram efeitos antiproliferativos do mesmo. Este decréscimo da proliferação celular deveu-se à ativação de PPAR- $\gamma$  pelo derivado sintético de retinoide. Finaliza com a afirmativa de que a ativação de PPAR- $\gamma$  representa um novo alvo para a terapia antitumoral em CCECP.

Kourelis et al.<sup>150</sup>, ao dosarem os níveis de PPAR- $\gamma$  do epitélio laríngeo normal e tumoral (hiperplasia, displasia e carcinoma de células escamosas), encontraram valores distintos entre as diferentes apresentações histopatológicas, porém sem valor estatístico significativo. Interessantemente, a expressão de PPAR- $\gamma$  aumentava do epitélio normal para o neoplásico, com as maiores concentrações em carcinoma laríngeo.

Nakashiro et al.<sup>151</sup>, ao dosarem os níveis e a função de PPAR- $\gamma$  de fragmentos de tecido e de cultura de carcinoma de células escamosas oral, encontraram aquele receptor presente, porém não ativo. Apesar da perda de função do PPAR- $\gamma$ , os ligantes sintéticos empregados nas células causaram inibição do crescimento

tumoral. Sugerem, portanto, que a função de PPAR- $\gamma$  está inativa na cultura celular estudada e que o efeito antiproliferativo dos agonistas de PPAR- $\gamma$  utilizados foi independente de PPAR- $\gamma$ .

Nikitakis et al.<sup>146</sup> relataram significativa inibição do crescimento celular de carcinoma de células escamosas oral humano em cultura com o uso de anti-inflamatório não esteroideal – sulindac; o que é mediado, pelo menos em parte, por indução da apoptose. Os autores sugerem que o aumento de expressão de PPAR- $\gamma$  e sua ativação podem ser em decorrência do sulindac. Concluem, portanto, que sulindac age por outras vias, além da inibição de atividade catalítica de COX-2, para ter efeito antiproliferativo.

Em outra publicação, Nikitakis et al.<sup>152</sup> relataram que o tratamento com prostaglandina J<sub>2</sub> (15-PGJ<sub>2</sub>), conhecido agonista PPAR- $\gamma$ , induziu redução significativa do crescimento de células tumorais de carcinoma de células escamosas oral, que foi atribuído à indução da apoptose. Interessantemente, rosiglitazone e ciglitazone, agonistas sintéticos de PPAR- $\gamma$ , não exerceram efeito inibidor no crescimento celular. Concluem que os efeitos de 15-PGJ<sub>2</sub> podem estar ligados a eventos em parte não mediados por PPAR- $\gamma$ , como a redução e eventual eliminação dos níveis da proteína ativadora de transcrição 3 (*Stat 3*), mas também não afastam que os mecanismos antitumorais de 15-PGJ<sub>2</sub> possam também estar relacionados com a via PPAR- $\gamma$ . A falta de atuação em *Stat 3* pelos agonistas sintéticos do PPAR- $\gamma$  testados neste trabalho sugere que a ativação da via PPAR- $\gamma$  isoladamente não foi suficiente para induzir efeito antineoplásico em carcinoma de células escamosas oral.

Similarmente, Fukuchi et al.<sup>147</sup> relataram que o tratamento com 15-PGJ<sub>2</sub>, mas não troglitazone, induziu apoptose de carcinoma de células escamosas oral humano,

via ativação da liberação de citocromo c da mitocôndria e ativação de caspase. Sugerem que os mecanismos de inibição do crescimento de carcinoma de células escamosas oral de humanos são diferentes para troglitazone e para 15-PGJ<sub>2</sub>. Não concluem se a ação pró-apoptótica de 15-PGJ<sub>2</sub> é ou não dependente da via PPAR- $\gamma$ .

Os genes regulados pelos ligantes de PPAR- $\gamma$  em células tumorais, com efeitos antiproliferativos e pró-diferenciação, estão sendo elucidados. Há um aumento de expressão de p21 e ou de p27, inibidores de quinase dependente de ciclina (CDK), em células tumorais expostas aos ligantes de PPAR- $\gamma$ <sup>133</sup>. Expressão moderada de atividade de uma variedade de citocinas inflamatórias e fatores transcricionais, como interferon- $\alpha$ , interleucinas 1 e 4, além de NF $\kappa$ B, diminuem o crescimento das células transformadas<sup>127</sup>.

Dannenberg et al.<sup>153</sup> sugerem que os ativadores de PPAR- $\gamma$  inibam a expressão de COX-2, possivelmente por interferirem de forma negativa com a expressão dos fatores transcricionais, como NF- $\kappa$ B em CCECP.

Ligantes de PPAR- $\gamma$  podem induzir apoptose pela ativação da caspase-3, o que está associado em algumas células tumorais com uma diminuição da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL<sup>127</sup>. Outros autores têm mostrado a ação antiangiogênica tumoral das tiazolidinedionas, pois o PPAR- $\gamma$  está expresso em altas concentrações no endotélio tumoral e pode ser aí ativado por seus ligantes<sup>154</sup>.

Como visto, existe na literatura fortes indícios que algumas das ações dos ligantes de PPAR- $\gamma$  pareçam ser independentes de PPARs<sup>127,155</sup>. Um dos fundamentos seria a observação de determinadas tiazolidinedionas em inibirem a biossíntese de colesterol e afetarem o efluxo do mesmo das células, enquanto outras não os fariam<sup>156</sup>. Esta resposta seletiva sugere que a ação dos ligantes possa em parte

não ser mediada pelos PPARs<sup>127</sup>. O outro seria a ação positiva de um agonista PPAR- $\gamma$  em controlar o crescimento tumoral, quando PPAR- $\gamma$  não está expresso ou ativo no tumor. A diminuição da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e de ciclina D1 parece ser ação direta dos ligantes de PPAR- $\gamma$ , sem participação de PPARs<sup>133</sup>. Palakurthi et al.<sup>155</sup> validaram o mecanismo de ação das tiazolidinedionas, como independente de PPAR- $\gamma$ , ao induzirem uma parada no ciclo celular em G1 de células embrionárias de camundongos de forma semelhante em dois grupos distintos quanto à expressão presente ou ausente de PPAR- $\gamma$ .

Resultados controversos são encontrados na literatura quanto às ações de agonistas PPAR- $\gamma$  que, variavelmente, fornecem evidência que estimulando a função de PPAR- $\gamma$  pode-se inibir a carcinogênese ou estimular o crescimento tumoral<sup>157-159</sup>.

Uma das teorias que vem ganhando espaço é a de que ligantes de PPARs causam câncer por alterar a expressão de um grupo de genes em particular que afeta o índice de proliferação celular<sup>117</sup>. Ligantes de PPARs induzem a expressão de genes reguladores de crescimento antes da entrada das células na fase de síntese (S) do ciclo celular<sup>160</sup>. Assim, a indução dos oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc* pelos ligantes de PPARs reflete o potencial de promoção tumoral que estas substâncias apresentam<sup>117</sup>.

As diferentes respostas ao uso de ligantes de PPARs *in vitro* e *in vivo*, em alguns estimulando a formação de neoplasias e em outros inibindo a formação das mesmas, podem ser explicadas em parte pela atuação de que estas substâncias desencadeiam – de forma diferente em culturas celulares tumorais e modelos animais distintos – em alguns induzindo predominantemente a diferenciação celular e em outros a replicação celular<sup>161</sup>.

Outro fator de interferência é o nível de expressão de PPAR- $\gamma$  no tumor em comparação à mucosa normal adjacente e se este está ou não ativo. A presença de determinados carcinógenos aumentando a expressão de PPAR- $\gamma$  também pode justificar os efeitos tão diversos de agonistas e antagonistas de PPAR- $\gamma$  descritos na literatura.

O mecanismo pelo qual a expressão reduzida de PPAR- $\gamma$  estaria correlacionada com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de esôfago é semelhante ao até agora exposto para carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

Terashita et al.<sup>162</sup>, ao dosarem a expressão do RNA mensageiro de PPAR- $\gamma$  em tecido esofágico normal e neoplásico de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas do esôfago, encontraram uma diminuição significativa da mesma no tecido tumoral quando comparada ao epitélio esofágico habitual. Além disso, observaram que a expressão do RNA mensageiro de PPAR- $\gamma$  era menor nos tumores com extensa metastatização ganglionar, com consequente sobrevida menor destes pacientes. Concluem que o nível de expressão do RNA mensageiro de PPAR- $\gamma$  pode ser um fator prognóstico no pós-operatório de pacientes com câncer de esôfago.

Hashimoto et al.<sup>163</sup> avaliaram *in vitro* e *in vivo* a resposta de carcinoma de células escamosas de esôfago ao uso de troglitazone sozinho ou em combinação com o ácido 9-*cis* retinoico. Todas as culturas celulares expressavam PPAR- $\gamma$ . Encontraram uma inibição significativa do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*, a qual foi potencializada pelo retinoide.

Fujii et al.<sup>164</sup> obtiveram os mesmos bons resultados na inibição do crescimento tumoral ao utilizarem troglitazone ou pioglitazone em diferentes culturas de carcinoma de células escamosas esofágico. PPAR- $\gamma$  estava expresso em todas as



linhagens celulares estudadas. Concluíram que troglitazone inibiu o crescimento tumoral por interromper o ciclo celular em G1 e por induzir apoptose.

Contraditoriamente ao até aqui exposto, Takahashi et al.<sup>165</sup> relataram que o uso de antagonistas de PPAR- $\gamma$  em altas doses inibiram o crescimento celular e induziram apoptose de diferentes linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de esôfago. Os mesmos antagonistas, em baixas doses, diminuíram a invasão tumoral, mas não modificaram os índices de proliferação celular e apoptose – o que não pôde ser devidamente explicado pelos autores. Como já citado anteriormente, a literatura traz que a inibição de PPAR- $\gamma$  pode ser benéfica em tratar determinadas neoplasias<sup>157,158</sup>. PPAR- $\gamma$  está superexpressa em muitos tumores, mas perda da função do mesmo por mutação é um evento raro<sup>166</sup>, o que sugere que este receptor é um fator de sobrevivência da célula tumoral. No estudo de Takahashi et al.<sup>165</sup>, PPAR- $\gamma$  estava superexpresso nos tumores esofágicos comparado com a mucosa normal. Em decorrência disso houve resposta antitumoral aos antagonistas de PPAR- $\gamma$ . Via de regra, quanto menos diferenciado era o tumor, maior era a expressão de PPAR- $\gamma$ .

A pergunta-chave que necessita ser respondida é se seres humanos estão ou não sob o risco de desenvolver certos tipos de tumor maligno quando expostos aos ligantes de PPARs e se é possível, com a informação molecular disponível, pesar os riscos e benefícios do uso destas substâncias em humanos<sup>117</sup>. Questionamentos de como determinadas substâncias como ligantes de PPARs, que induzem diferenciação terminal, inibem crescimento celular e possuem ação no sistema imune com consequente efeito anti-inflamatório, podem, paradoxalmente, promover crescimento celular e modular a apoptose permanecem sem resposta<sup>161</sup>.

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos principais:

- 1) Avaliar os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (óleo de peixe) como potencial agente de quimioprevenção na carcinogênese da via aerodigestiva superior iniciada em camundongos Swiss, com o uso de 4-NQO;
- 2) Avaliar os efeitos do pioglitazone, um agonista PPAR- $\gamma$ , como potencial agente de quimioprevenção na carcinogênese da via aerodigestiva superior iniciada em camundongos Swiss, com o uso de 4-NQO.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Informações gerais do estudo

##### A) Biotério

O biotério onde o estudo foi realizado pertence à Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR), em Curitiba. Todo trabalho experimental foi previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade Evangélica do Paraná e da Universidade de São Paulo, seguindo as normas de manipulação de animais estipuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

O biotério é adequado quanto ao ciclo claro-escuro (12-14 h/dia), temperatura (20–25 °C) e umidade do ar (40–60%). Água e ração eram administrados *ad libitum*. A ração fornecida aos animais é a padrão para camundongos: Nuvilab CR-1<sup>®</sup>, da Nuvital (formulação em anexos).

##### B) Animais

Os animais utilizados foram camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com 6 a 9 semanas de idade, provenientes do biotério da Universidade Positivo, sediada em Curitiba. Machos e fêmeas foram distribuídos em igual proporção entre os diferentes grupos. Os machos adultos pesavam em média 30 a 49 g e as fêmeas de 27 a 45 g. O consumo médio de água dos animais sadios variava de acordo com o peso e o sexo, sendo em média de 5 a 8 ml por dia, por animal. O consumo de ração dos animais sadios também era variável de acordo com o peso e o sexo, mas em média de 6 a 8 g para as fêmeas e de 8 a 10 g para os machos, por dia, por animal.

### **C) 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO)**

O carcinógeno em pó 4-NQO (Sigma-Aldrich) era semanalmente homogeneizado em propilenoglicol em uma concentração final de 5 mg/ml, resultando em uma solução que era armazenada em geladeira mantida em uma temperatura de 4°C. Esta solução era diluída na água dos animais em uma concentração final de 100 µg/ml, 50 µg/ml ou 25 µg/ml e trocada a cada 48 h/72 h, durante oito semanas. As garrafas eram devidamente protegidas da luz do biotério, envoltas em papel alumínio, visto que o 4-NQO é fotossensível.

### **D) Óleo de peixe (op)**

Cápsulas de 1 grama de ômega-3 eram fornecidas pelo laboratório de manipulação *Cosmética*, localizado em Curitiba. Cada cápsula continha 12,5% de ácido docosahexaenoico (DHA – 125 mg); 17,5% de ácido eicosapentanoico (EPA – 175 mg) e 10 mg de vitamina E (a-tocoferol).

### **E) Agonista PPAR—?**

**Agonista do PPAR-?** era fornecido pelo laboratório Abbott (Actus<sup>®</sup> – pioglitazone), cuja apresentação é sob a forma de comprimidos de 15mg ou de 30mg.

### **F) Divisão dos grupos e duração do experimento**

Os animais eram agrupados de acordo com o sexo, em número de cinco a seis por caixa. Cada caixa era identificada pelo nome do grupo em algarismo romano seguida das letras A, B, C ou D. Assim, o grupo I (piloto) tinha quatro caixas: IA, IB, IC, ID. Em cada caixa, os animais eram devidamente marcados com ácido pícrico na

cabeça, dorso, cauda, flanco direito ou flanco esquerdo – com o objetivo de identificar cada camundongo e acompanhá-los individualmente quanto ao peso quinzenal e datas do óbito ou eutanásia. De acordo com as marcações, os animais eram identificados por algarismos arábicos colocados após a denominação do grupo. Assim, a caixa IA apresentava os seguintes animais: I-1, I-2, I-3, I-4, I-5. Já a caixa IB apresentava os animais: I-6, I-7, I-8, I-9 e I-10, e, assim, sucessivamente com as demais caixas.

O experimento foi composto por grupos submetidos à indução tumoral com 4-NQO em diferentes doses, também chamados de grupos controle, e por grupos que recebiam este agente e quimioprevenção com óleo de peixe ou com pioglitazone, em diferentes fases da carcinogênese. Além disto, um grupo de 10 animais (grupo 0), que recebia apenas água e ração, foi mantido durante a realização de todo o experimento, a fim de monitorizar as condições físicas do biotério. Foi também criado o grupo VI, composto por 10 animais, que recebeu apenas o veículo glicólico – propilenoglicol na água por oito semanas. Este grupo nasceu da necessidade de excluir os efeitos adversos deste veículo glicólico, já que o 4-NQO é diluído no mesmo e misturado na água filtrada dos animais.

Os animais eram pesados semanalmente para avaliar se havia sinais clínicos de câncer avançado como caquexia, apatia, letargia ou agonia, sendo devidamente encaminhados para sacrifício em câmara de CO<sub>2</sub>.

Após as oito semanas de indução tumoral e/ou quimioprevenção, os animais foram mantidos no biotério por mais 24 semanas, quando recebiam quimioprevenção (grupos com quimioprevenção) ou eram simplesmente observados (grupos controle). A duração total do experimento foi de 32 a 34 semanas.

### **G) Preparo das dietas**

Inicialmente, nos animais dos **grupos II, III, IV e V**, os agentes de quimioprevenção eram adicionados e misturados à ração farelada e fornecidos aos animais dentro de comedouros suspensos, sendo feitas e trocadas a cada 24 ou 48 horas.

Como a manipulação da ração pelos roedores era intensa, muito se perdia no fundo da caixa misturado ao cepilho. Desta forma, procurou-se modificar a dieta fornecida para **os grupos X, XI, XII, XIII**, misturando-se a ração farelada aos agentes de quimioprevenção e, após, solidificando a mesma para que ela pudesse ser suspensa nas grades, como é feita com a ração habitual, evitando, assim, que ela ficasse em contato direto com os animais. Com isto, minimizaram-se consideravelmente os desperdícios de ração. Houve também a possibilidade de realizar o preparo semanal das rações (ao invés de ser a cada 24 ou 48 horas) e a simples reposição das mesmas (a cada três a quatro dias), ao invés da troca constante.

O preparo das rações foi devidamente testado após o estudo farmacológico dos agentes de quimioprevenção da pesquisa e a eventual interferência dos aglutinantes a serem acrescentados para que a ração solidificasse a ponto de poder ser roída sem esfarelar-se, sendo testada nos roedores e aprovada. A receita foi idealizada pelo Laboratório do Curso de Farmácia e Bioquímica do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB) e consiste dos seguintes passos:

- 1) Preparo da cola de amido a 10%: 25g de amido de milho misturado em 225 ml de água. Os ingredientes são misturados e aquecidos até que se forme uma pasta sólida e consistente;

- 2) 300 g de ração farelada são devidamente misturadas com um comprimido de 30 mg de pioglitazone moído – concentração final de 100 ppm ou com quinze cápsulas de ômega-3 (1 g cada) – 5% de concentração final. Além disso, é acrescentado 0,7 g de antimofa da Mix<sup>®</sup> (2,5%);
- 3) À ração farelada acrescentada de um dos agentes de quimioprevenção e de antimofa, mistura-se com a mão ou pistilo 40 g da cola de amido e 110 g de gel de confeitaria da Mix<sup>®</sup> (agentes aglutinantes), fracionando-se a dieta e misturando cada fração com pequenas quantidades de aglutinantes para que os mesmos se integrem à ração contendo os agentes de quimioprevenção. Uma vez integrados, misturam-se todas as frações na mesma bacia, tendo-se os 300 g prontos para serem enformados;
- 4) A ração com agentes de quimioprevenção, antimofa e agentes aglutinantes é devidamente enformada e deixada para secar. Uma a duas horas depois, sua consistência firme permite o desenforme nos comedouros suspensos e fornecimento aos animais.

### 3.2 Indução da carcinogênese – Fase 1

A indução da carcinogênese da via aerodigestiva superior em camundongos albinos Swiss iniciou-se pelo **grupo I ou “piloto”**, composto de 18 animais com 6 semanas de idade. Também chamado de **grupo 4-NQO 100**, recebeu 4-NQO 100 µg/ml na água por 8 semanas seguidas e, após, eram observados por mais 24 semanas.

### 3.3 Quimioprevenção – Fase 1

Baseado nos resultados obtidos com a indução da carcinogênese, mais camundongos albinos Swiss foram incluídos no estudo e procedeu-se à indução da carcinogênese da mesma forma que no grupo I. Estes animais foram distribuídos em dois grupos para estudo posterior da quimioprevenção de acordo com a substância utilizada.

Os grupos criados foram assim nomeados e distribuídos:

- a) **Grupo II – 4-nqo 100 → op 10%**: recebeu 4-NQO 100 µg/ml na água por 8 semanas seguidas. Terminada a indução tumoral, recebeu 1 semana após, quimioprevenção com acréscimo de 10% de óleo de peixe (OP) na dieta por 24 semanas. Era composto por 20 animais;
- b) **Grupo III – 4-nqo 100 → ppar 300**: recebeu 4-NQO 100 µg/ml na água por 8 semanas seguidas. Terminada a indução tumoral, recebeu 1 semana após, quimioprevenção com acréscimo de 300 ppm de pioglitazone na dieta por 24 semanas. Era composto por 18 animais;
- c) **Grupo IV – op 10%**: recebeu acréscimo de 10% de óleo de peixe na dieta por 24 semanas. Era composto por 5 animais;
- d) **Grupo V – ppar 300**: recebeu acréscimo de 300 ppm de pioglitazone na dieta por 24 semanas. Era composto por 5 animais.

A figura 1 mostra em representação esquemática o modelo de indução tumoral e quimioprevenção dos grupos citados (escala de tempo em semanas - s):



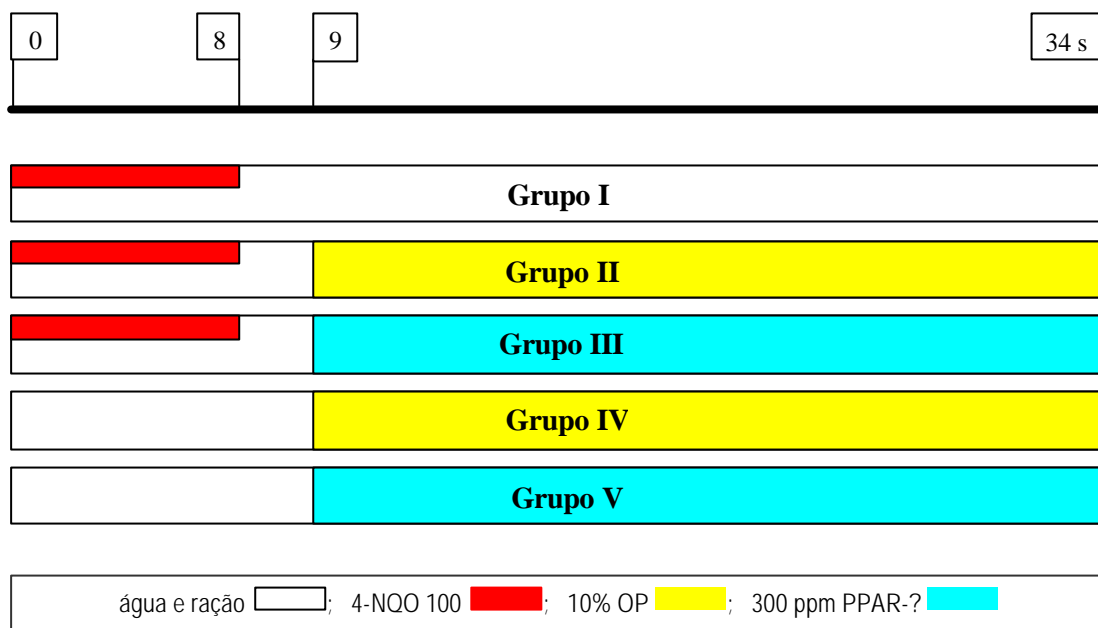


Figura 1 – Protocolo experimental I

### 3.4 Indução da carcinogênese – Fase 2

Com a constatação de que um grande número de animais desenvolvia tumores de extrema agressividade, levando a um número considerável de óbitos ou sacrifícios durante o período de quimioprevenção, viu-se a necessidade de se procurar induzir tumores de evolução mais lenta e, conseqüentemente, menos agressivos. Assim, novos grupos de animais foram adicionados ao estudo, com doses reduzidas de 4-NQO.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- a) **Grupo VII – 4-nqo 25:** recebeu 4-NQO 25 µg/ml por 8 semanas e não recebeu quimioprevenção. O grupo foi observado por mais 48 semanas. Composto por 24 animais;

b) **Grupo VIII – 4-nqo 50**: recebeu 4-NQO 50 µg/ml por 8 semanas e não recebeu quimioprevenção. O grupo foi observado por mais 24 semanas. Composto por 43 animais.

Constatou-se que boa parte dos animais do **grupo VIII** havia desenvolvido tumores na via aerodigestiva superior ao término das 24 semanas. Diferentemente do **grupo VII**, no qual boa parte dos animais não apresentava sinais clínicos de tumores invasores, no mesmo período, optando-se por observá-los por mais 24 semanas (após as 24 semanas convencionais), totalizando 48 semanas, quando era possível ver boa parte dos camundongos com neoplasia invasora.

Assim, foi observado que a dose ideal, com menor potencial letal de induzir tumores invasores no período necessário para o estudo (24 semanas após o término da indução), era de 50 µg/ml.

Estabelecida a dose mínima necessária para induzir câncer no período desejado, criou-se o **grupo IX**, que tinha o intuito de estudar a progressão da carcinogênese ao longo do tempo, sacrificando, a partir do término da indução tumoral, um a dois animais por semana, até o aparecimento das primeiras lesões invasoras (por volta da décima quinta semana após o término do 4-NQO). Este grupo também ficou conhecido como o grupo de análise da progressão das alterações histopatológicas induzidas após indução tumoral com 4-NQO 50 µg/ml na água por 8 semanas ao longo das 15 semanas que se sucederam após o término da administração do carcinógeno. Foi composto por 20 animais.

### 3.5 Quimioprevenção – Fase 2

Com a dose de 4-NQO estabelecida, criaram-se mais quatro grupos de indução tumoral: em dois, estudou-se a quimioprevenção com óleo de peixe e nos outros dois grupos restantes, a com pioglitazone.

Optou-se por reduzir a dose de PUFAS ômega-3 ou óleo de peixe para 5%, visto que alguns animais que fizeram uso da concentração 10% experimentaram reações cutâneas severas, com formação de placas e crostas, descamação e queda de pelos, o que necessitou o afastamento destes animais no começo do estudo. A dose de pioglitazone foi também reduzida de 300 ppm para 100 ppm, visto a formação de neoplasia gástrica agressiva no grupo 4NQO 100 → PPAR 300, optando-se não apenas por reduzir a dose de 4-NQO mas também de pioglitazone.

Além da quimioprevenção **após** a indução tumoral com 4-NQO em dois grupos, foi realizada também a quimioprevenção **durante e após** a indução tumoral com 4-NQO nos dois grupos restantes, para que se pudesse estudar se o óleo de peixe ou o pioglitazone teriam algum efeito durante a fase de iniciação da carcinogênese. Assim, foram nomeados e distribuídos os quatro novos grupos adicionados à pesquisa:

- a) **Grupo X – 4-nqo 50 → op 5%**: recebeu 50 µg/ml de 4-NQO por 8 semanas seguidas. Terminada a indução tumoral, foi fornecida uma semana após, quimioprevenção com óleo de peixe (acrécimo de 5% na dieta), por 24 semanas. Este grupo era composto por 20 animais;
- b) **Grupo XI – 4-nqo 50 + op 5% → op 5%**: recebeu 50 µg/ml de 4-NQO por 8 semanas concomitantemente à quimioprevenção com óleo de peixe (acrécimo de 5% na dieta). Após o término da indução tumoral, a

quimioprevenção persistiu por mais 24 semanas até o término do estudo.

Este grupo era composto por 18 animais;

- c) **Grupo XII – 4-nqo 50 → ppar 100**: recebeu 50 µg/ml de 4-NQO na água por 8 semanas seguidas. Terminada a indução tumoral recebeu, uma semana após, quimioprevenção com acréscimo na dieta de 100 ppm de pioglitazone, por 24 semanas. Este grupo era composto por 21 animais;
- d) **Grupo XIII – 4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100**: recebeu 50 µg/ml de 4-NQO na água por 8 semanas seguidas concomitantemente à quimioprevenção com acréscimo na dieta de 100 ppm de pioglitazone. Após o término da indução tumoral, a quimioprevenção persistiu por mais 24 semanas até o término do estudo. Este grupo era composto por 20 animais.

A figura 2 mostra em representação esquemática o modelo de indução tumoral e quimioprevenção dos grupos X, XI, XII e XIII (escala de tempo em semanas - s):

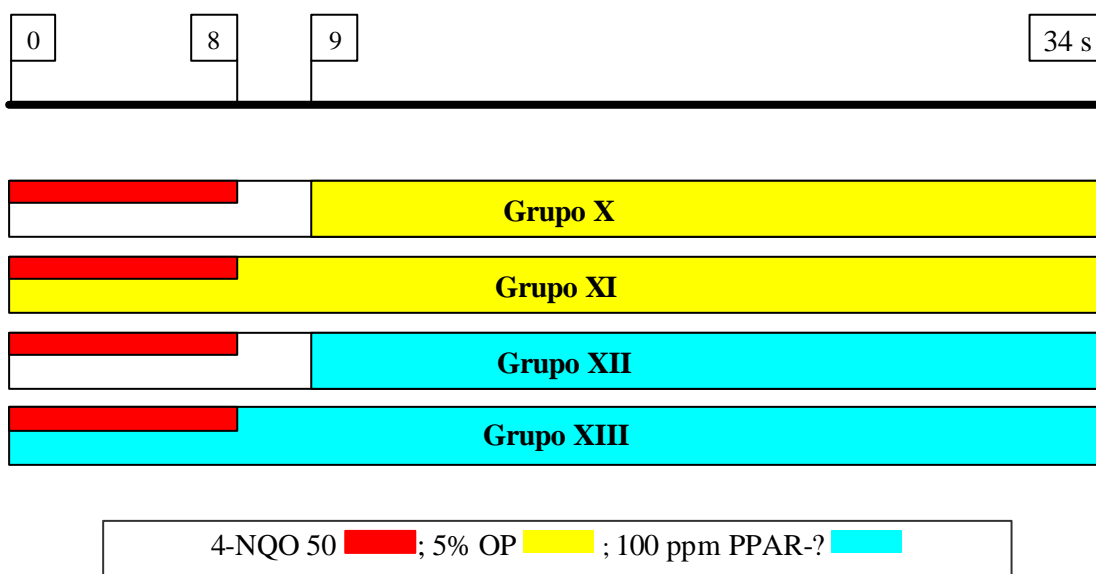


Figura 2 – Protocolo experimental II

### 3.6 Necrópsia e avaliação histológica

O estudo era terminado 34 semanas após seu início. Os animais eram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> ao final do estudo ou quando apresentavam sinais de caquexia ou sofrimento por progressão tumoral, sendo o animal, neste momento, submetido à necrópsia e os órgãos de interesse extraídos e enviados para o laboratório.

Durante a necrópsia, por sacrifício ou óbito, toda cavidade oral era inspecionada à procura de tumorações e se prosseguia com a retirada de todo o andar inferior da cavidade oral em monobloco com o esôfago e estômago. O esôfago era aberto em sentido longitudinal e o estômago em sua pequena curvatura. Resíduos alimentares eram devidamente removidos e o bloco língua – esôfago – estômago era devidamente fixado em papel filtro e isopor e imerso em formalina a 10%. Na grande maioria dos animais houve documentação fotográfica digital da macroscopia (figura 3).

Eram também removidos fígado, pulmões e eventuais linfonodos do mediastino e cervicais suspeitos, além de outros órgãos ou tecidos que apresentassem sinais de infiltração neoplásica, sendo todos embebidos em formalina a 10% e, posteriormente, enviados aos laboratórios de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Positivo de Curitiba, onde o andar inferior da cavidade oral era processado e analisado por um patologista, e ao laboratório de Pesquisa do Curso de Odontologia da Universidade do Vale do Itajaí, onde o esôfago, o estômago e outros órgãos ou tecidos eram processados e analisados por um segundo patologista.

Os laboratórios recebiam o frasco contendo os órgãos e tecidos, devidamente identificados e rotulados, com a macroscopia descrita nos rótulos, além da data do

óbito ou sacrifício, grupos, subgrupos, marcações e pesos para posterior comparação com a microscopia, como exemplificado abaixo:

*Ex: Camundongo Grupo IIA1. Sacrifício em 210109. Grande tumor exofítico de dorso lingual. Pequeno tumor em ventre lingual. Pequenas tumorações em terço médio de esôfago. Grande tumoração estenosante em transição esôfago-gástrica. Nódulo pulmonar a esclarecer. Amostrado fígado, linfonodos do mediastino e cervicais de aspecto habitual.*

### 3.7 Procedimento metodológico do preparo do material para microscopia

As amostras contidas em frascos contendo formol foram analisadas quanto à textura, cor e presença de tumor. Nas regiões que apresentaram alterações de morfologia macroscópica foram realizadas hemiseções de peças no sentido longitudinal, confeccionando um plano de corte para cada área identificada como patológica. Uma vez realizados os planos de corte macroscópicos, os espécimes seguiram para inclusão e corte.

#### **A) Preparo histopatológico**

Os fragmentos foram submetidos à desidratação em bateria ascendente de alcoóis, obedecendo a seguinte ordem: álcool 70, 80 e 95°GL, com uma hora de duração em cada um, seguindo-se por três banhos de álcool absoluto, um de álcool-xilol (50% álcool e 50% xilol), três banhos de xilol e dois banhos de uma hora cada de parafina, complementados por emblocamento do fragmento em Cassete. Com a

solidificação da parafina, os blocos foram levados ao micrótomo (Leica Microsystems, USA) para a realização de cortes seriados com 3  $\mu\text{m}$  de espessura cada.

Foram obtidos em média sete cortes por espécime, sendo distendidos em lâmina de vidro e levados à estufa (Olides-cz, São Paulo, Brasil) a 60°C para secagem. Para a remoção da parafina foram realizados três banhos de xilol (5 minutos cada) e mais três banhos de álcool absoluto (5 minutos cada). Entre os banhos de xilol e álcool absoluto, um de álcool-xilol foi empregado.

Com a finalidade de reidratar os cortes, estes foram submetidos a uma bateria de álcool descendente: 90, 80 e 50° GL, finalizando com a lavagem em água destilada. A seguir, foi realizada a coloração em hematoxilina por meio da imersão das lâminas com os cortes montados por 4 minutos e, após, lavados em água corrente por 5 minutos para remoção do excesso do corante, seguido de um banho de álcool 70°GL por quinze segundos.

As lâminas foram imersas em eosina por vinte segundos, removendo-se o excesso deste corante com dois banhos de álcool 96° GL por 15 segundos cada. A seguir, foi realizada a desidratação, lavando-se as lâminas por três vezes sucessivas em álcool absoluto por um minuto em cada vez. Terminados os banhos de álcool, as lâminas foram mergulhadas em um recipiente com álcool-xilol (álcool absoluto e xilol puro) e por mais três vezes em outro recipiente contendo apenas xilol (puro), permanecendo um minuto em cada imersão.

Encerrado o processo de coloração, desidratação e diafanização, confeccionou-se a montagem das lamínulas com bálsamo do Canadá, para análise microscópica da lâmina.

## B) Análise histopatológica das lesões

### I) Cavidade oral

As lesões de cavidade oral eram classificadas de acordo com os critérios da WHO Collaborating Centre on Oral Precancerous Lesions<sup>167</sup> e de Bryne et al<sup>168</sup>.

Área de **hiperqueratose** foi definida como a presença de camada espessa de queratinócitos, sem atipia celular ou nuclear.

O diagnóstico histopatológico de displasia (para qualquer órgão da VADS) levou em consideração a presença de alguns ou de todos os seguintes critérios: núcleos e células aumentados, nucléolo evidente, razão núcleo – citoplasmática aumentada, núcleo hipercromático, disceratose, mitoses por campo aumentadas, figuras mitóticas anormais, perda de polaridade epitelial ou perda de coesão celular típica. Foi subclassificada em:

- Displasia discreta ou leve: os espécimes classificados como displasia discreta exibiam alterações celulares e teciduais sem infiltração de tecido conjuntivo e que se estendiam da área de células basais à aproximadamente o 1/3 inferior do tecido epitelial analisado;
- Displasia moderada: tecido epitelial que exibiu alterações morfológicas e teciduais que se estendiam de área basilar aos 2/3 inferiores do epitélio analisado;
- Displasia intensa ou carcinoma *in situ*: alterações morfológicas superavam a altura de 2/3 inferiores do tecido epitelial analisado ou comprometiam toda a espessura do epitélio, sem invasão da membrana basal.

Como a classificação das displasias era de certa forma um tanto subjetiva, adotou-se como critério, neste trabalho, de classificá-las em duas: **displasia discreta**



à **moderada** – quando as lesões vistas encontravam-se nos critérios de displasia discreta ou de displasia moderada –, e **carcinoma *in situ*** – quando as alterações epiteliais morfológicas comprometiam praticamente todo o epitélio ou comprometiam todo o epitélio.

Com relação às lesões invasoras de língua, os critérios de denominação das mesmas na microscopia são as descritas abaixo.

O diagnóstico de **carcinoma verrucoso** era fornecido para aquelas lesões de aspecto verruciforme na macroscopia e na microscopia (predominância no crescimento exofítico), com intensa displasia, com ou sem invasão discreta da membrana basal.

Já os **carcinomas de células escamosas superficialmente invasivos** eram neoplasias que exibiam invasão não mais que em 3 mm de profundidade.

Todas as invasões francas do estroma foram classificadas como **carcinoma invasor**, sendo graduadas de acordo com o grau de diferenciação celular:

- Carcinoma bem diferenciado: arquitetura tecidual neoplásica similar ao epitélio escamoso, poucas alterações displásicas e intensa formação de pérolas córneas;
- Carcinoma moderadamente diferenciado: arquitetura tecidual com moderado pleomorfismo celular, pouca atividade mitótica e hiperqueratótica;
- Carcinoma pouco diferenciado: predomínio de células imaturas, contendo numerosas atividades mitóticas (acima de 4 mitoses / campo em 400×) e mínima queratinização.

Como a classificação por graus em cavidade oral e esôfago era variável, havendo a presença, no mesmo animal, em algumas situações, de graus variados de tumor no mesmo órgão ou em órgãos distintos, optou-se por não apresentar estes graus nos resultados e colocar, para fins didáticos, todos os carcinomas invasores em um mesmo grupo, sem distinção de grau.

Em um animal foi encontrado **carcinoma mucoepidermoide** de língua, provavelmente originado de glândulas salivares menores. Na microscopia, havia presença de células epidermoides, mucoides, intermediárias, claras e colunares.

## II) Esôfago e pré-estômago

O pré-estômago ou antro cardíaco de camundongos é uma continuação do esôfago. Também considerado uma câmara de armazenamento de alimento, seu epitélio de revestimento estratificado pavimentoso é semelhante e contíguo ao do esôfago, revestindo quase a metade do estômago em seu fundo e grande curvatura (figuras 37, 38, 39). O estômago propriamente dito ou antro pilórico apresenta epitélio de revestimento glandular semelhante ao epitélio de revestimento gástrico humano.

Em função da similaridade do epitélio do pré-estômago com o do restante da VADS, o antro cardíaco também foi suscetível à carcinogênese induzida pelo 4-NQO. Os critérios utilizados para classificar as lesões esofágicas ou gástricas foram os descritos por Wang et al.<sup>169</sup> e Rubio et al.<sup>170</sup> :

- **Hiperqueratose:** presença de camada espessa de queratinócitos, sem atipia celular ou nuclear;
- **Displasias de baixo grau:** são todas consideradas displasias leves. Os espécimes classificados como displasia de baixo grau exibiam alterações

celulares e teciduais sem infiltração de tecido conjuntivo e que se estendiam da área de células basais à aproximadamente o 1/3 inferior do tecido epitelial analisado;

- **Displasia de alto grau:** tecido epitelial que exibiu alterações morfológicas e teciduais que se estendiam de área basilar aos 2/3 inferiores ou mais do epitélio analisado. Era necessária presença de mínima maturação epitelial;
- **Carcinoma *in situ*:** sua diferença para a displasia de alto grau é que o carcinoma *in situ* não tem maturação superficial do epitélio, ou seja, todo o epitélio é displásico, com membrana basal íntegra;
- **Carcinoma verrucoso:** lesões de aspecto verruciforme na macroscopia e na microscopia (predominância no crescimento exofítico), com intensa displasia, com ou sem invasão discreta da membrana basal;
- **Carcinoma de células escamosas invasor:** quando havia invasão franca do estroma, o carcinoma era tido como invasor. Dependendo do envolvimento das camadas do esôfago, ele subclassificava-se em invasor até a **submucosa**, invasor até a **muscular própria**, invasor até a **adventícia** no caso do esôfago ou até a **serosa** no caso do pré-estômago.

As mesmas considerações que foram feitas para o grau de diferenciação dos carcinomas de cavidade oral valem para esôfago e pré-estômago, incluindo a opção por não detalhar os graus nos resultados, pelos mesmos motivos anteriormente expostos.

### 3.8 Método da análise da incidência das diferentes lesões pré-invasoras e invasoras na mucosa da VADS

Ao se analisar a incidência de neoplasias invasoras em VADS, algumas normativas foram estabelecidas. No caso de um mesmo animal apresentar mais de uma lesão invasora em cavidade oral ou em esôfago ou em pré-estômago, considerou-se a mais grave de cada órgão, para que não houvesse um resultado superestimado da incidência de neoplasias invasoras nos diferentes sítios. Também, no caso da concomitância de uma lesão invasora com as pré-invasoras, considerou-se a invasora. Apesar da incidência de lesões pré-invasoras estar subestimada, está implícita a sua presença nos animais com lesões invasoras, visto que quase sempre estavam presentes. Assim, neste estudo, foram comparadas apenas as porcentagens de incidência das lesões invasoras da VADS e não das pré-invasoras. Estas apenas foram contabilizadas quando as invasoras estavam ausentes. Assim, as tabelas apresentam a ausência ou presença de carcinoma invasor. Os ausentes correspondem, em sua grande maioria, à presença de lesões pré-neoplásicas.

### 3.9 Análise estatística

Com as informações obtidas com os experimentos foi criado um banco de dados no programa “Excel for Windows”, o qual foi posteriormente utilizado para análise estatística.

**A) Teste de  $\chi^2$  e teste de Fisher**

Foram utilizados com a finalidade de comparar as incidências de neoplasias entre os grupos. Foi considerado significância estatística quando o valor de p foi menor que 0,05 (5%).

**B) Kaplan-Meier e *logrank***

Para a análise de sobrevivência foi utilizado o estimador não-paramétrico de Kaplan-Meier e para comparar as curvas de sobrevivência foi utilizado o teste de *logrank*<sup>171,172</sup>. Foi considerado significância estatística quando o valor de p foi menor que 0,05 (5%).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efetividade do modelo de indução tumoral de CCE da via aerodigestiva superior em camundongos Swiss

O número de animais que recebeu apenas 4-NQO com doses distintas - 25, 50 e 100 µg/ml (grupos controle) foi de 78. Ao final do experimento, a grande maioria destes, **89,7%**, desenvolveu carcinoma de células escamosas invasor da cavidade oral e/ou do esôfago e/ou do pré-estômago, variando na quantidade de lesões invasoras no mesmo órgão e no mesmo animal, além da variação de invasão em profundidade nos órgãos estudados. Oito animais, **10,2%**, não desenvolveram neoplasia invasora em um período considerado hábil para que a carcinogênese com 4-NQO nas doses estudadas chegasse ao ponto final esperado da indução tumoral – o da invasão franca; mas apresentavam lesões pré-neoplásicas, sendo 1 do grupo 4-NQO 100, 1 do grupo 4-NQO 25 e 6 do grupo 4-NQO 50.

A tabela abaixo traz a incidência de neoplasias invasoras por grupo (tabela 1). Nela estão inclusos 23 animais pertencentes ao grupo 4-NQO → 25, sendo importante lembrar que os animais deste grupo foram observados por 24 semanas a mais que os dos grupos 4-NQO 100 e 4-NQO 50.

Tabela 1 – Incidência e ausência de neoplasias invasoras em VADS entre grupos controle

Grupos (n)	Neoplasia invasora em VADS		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 100 (18)	17 (94,4)	1 (5,5)	0,38
4-nqo 50 (37)	31 (83,7)	6 (16,2)	
4-nqo 25 (23)	22 (95,6)	1 (4,3)	

\* O grupo 4-NQO 25 foi observado 24 semanas a mais que os demais grupos

\*\* VADS: via aerodigestiva superior

Aplicando-se o teste exato de Fisher, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasia invasora da VADS na comparação grupo a grupo:  $p = 0,40$  entre 4-NQO 100 e 4-NQO 50,  $p = 1,00$  entre 4-NQO 100 e 4-NQO 25 e  $p = 0,23$  entre 4-NQO 50 e 4-NQO 25.

## 4.2 Aspecto macroscópico e microscópico das lesões tumorais

### A) Cavidade oral

A carcinogênese induzida pelo uso de 4NQO nos grupos controle levou à formação de uma riqueza e multiplicidade de lesões tumorais de aspectos macroscópicos distintos uma das outras, muitas vezes no mesmo animal. A grande maioria dos animais desenvolveu lesões pré-neoplásicas ou invasoras em língua.

Era quase certo, na mesma língua, encontrar lesões pré-neoplásicas em associação com lesões invasoras. Assim como não era incomum encontrar duas lesões invasoras em língua ou em estruturas distintas da cavidade oral de um mesmo animal como assoalho da boca e língua simultaneamente.

Também era rico o aspecto macroscópico dos carcinomas de células escamosas (CCE). Tumores verrucosos (figura 4), lesões exofíticas com placas de queratinização abundante (figura 5), lesões ulceradas (figura 6) e até as endofíticas (figura 7) eram encontradas na língua. Neste órgão, grande parte das lesões encontrava-se no dorso e na base, junto à entrada da via respiratória superior. Outras áreas também foram documentadas em borda lateral e ventre lingual.

Nas outras estruturas da boca, lesões de aspecto verrucoso podiam ser vistas junto ao rebordo alveolar inferior e assoalho da boca (figura 8). Alguns animais

desenvolveram lesões infiltrativas, destrutivas de assoalho de boca, com invasão óssea e comprometimento de partes moles, o que exigiu eutanásia dos mesmos (figura 9). Em outros, a multiplicidade de lesões em cavidade oral chamava atenção não somente pelos aspectos distintos umas das outras, mas também pelo número de lesões (figura 10); aspecto este descrito anteriormente como sendo característico do modelo de carcinogênese desencadeado pelo 4-NQO e que não é visto na carcinogênese da VADS humana.

Apesar do exposto acima, é importante lembrar que o modelo de carcinogênese induzido pelo 4-NQO, em certos aspectos, é semelhante ao visto em humanos: como o de “campo de cancerização”. Assim, a grande maioria dos animais apresentava tumores primários invasores concomitantes em cavidade oral e esôfago e/ou pré-estômago, o qual apresenta revestimento pavimentoso (figura 11). Também era quase certo encontrar, no mínimo, uma lesão invasora em um órgão e no outro uma pré-neoplásica (figura 12). Como visto, esta abundância de neoplasias concomitantes em diferentes localizações na mucosa do trato aerodigestivo superior não é frequentemente encontrada na carcinogênese de CCECP em humanos.

Na microscopia, as lesões observadas em cavidade oral foram assim classificadas, conforme a evolução das mesmas no processo de carcinogênese:

- Características normais – revestido por epitélio estratificado pavimentoso
- Lesões pré-neoplásicas ou não invasivas
  - \* Hiperplasia epitelial - HE e/ou hiperkeratose (hiperqueratose) – HQ (figura 13)
  - \* Displasia discreta a moderada – DDM (figura 14)
  - \* Carcinoma *in situ* – CIS (figura 15)



➤ Lesões invasoras ou carcinoma invasor

- \* Carcinoma verrucoso – CV (figura 16)
- \* Carcinoma de células escamosas superficialmente invasor – CCESI
- \* Carcinoma de células escamosas invasor – CCEI (figuras 17, 18)
- \* Carcinoma mucoepidermoide – CM

As lesões invasoras podiam se apresentar com graus variados de diferenciação celular: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.

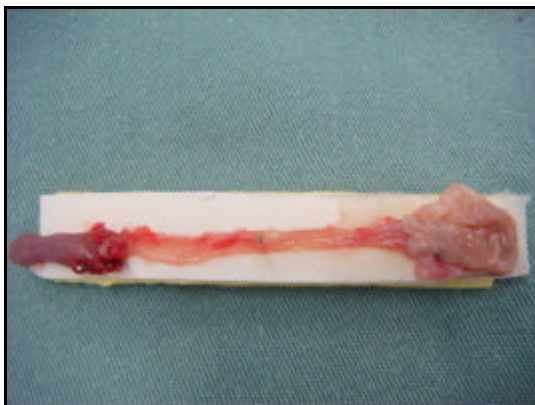


Figura 3 – Fixação da peça língua/esôfago/estômago



Figura 4 – CCE verrucoso de língua



Figura 5 – CCE exofítico de língua



Figura 6 – CCE ulcerado de língua

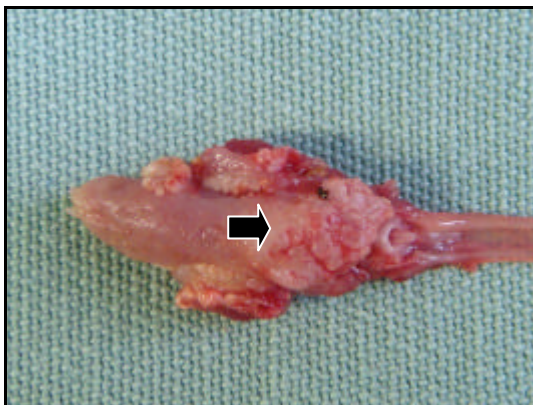


Figura 7 – CCE padrão infiltrativo de língua

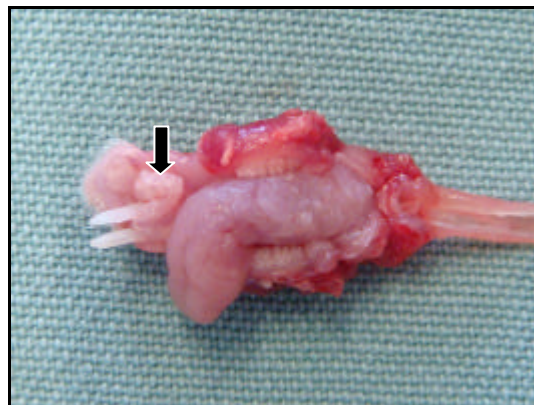


Figura 8 – CCE verrucoso em assoalho da boca



Figura 9 – CCE padrão infiltrativo de assoalho de boca

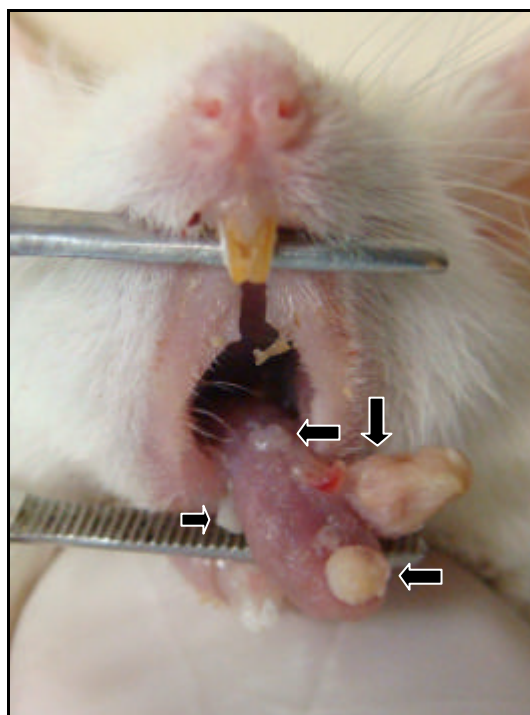


Figura 10 – Diversas lesões dispersas em língua – áreas neoplásicas e pré-neoplásicas

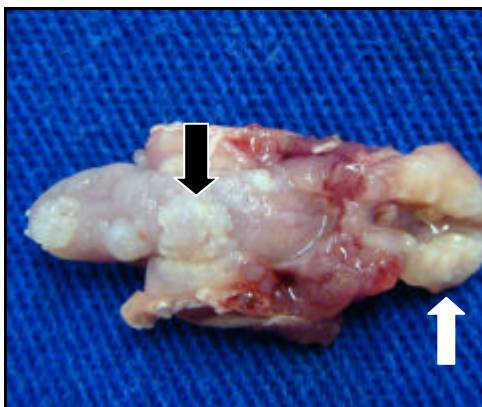


Figura 11 – Sincronicidade tumoral em órgãos da VADS – CCE de língua (seta preta) e de esôfago (seta branca)

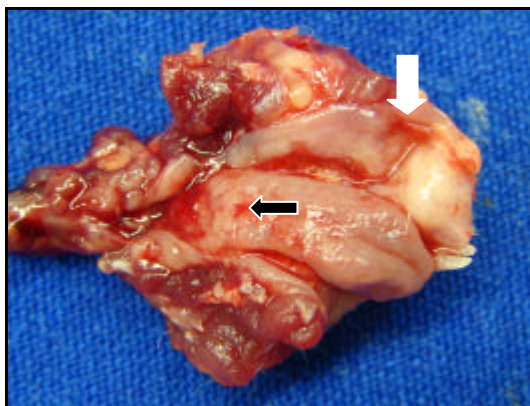


Figura 12 – Associação de CCE padrão infiltrativo de assoalho da boca (seta branca) com displasia discreta a moderada de língua (seta preta)



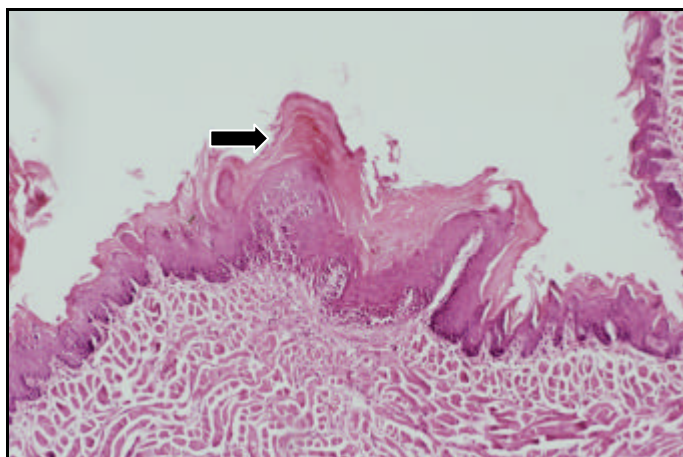


Figura 13 – Microfotografia do epitélio de língua com intensa hiperqueratose, HE 40X

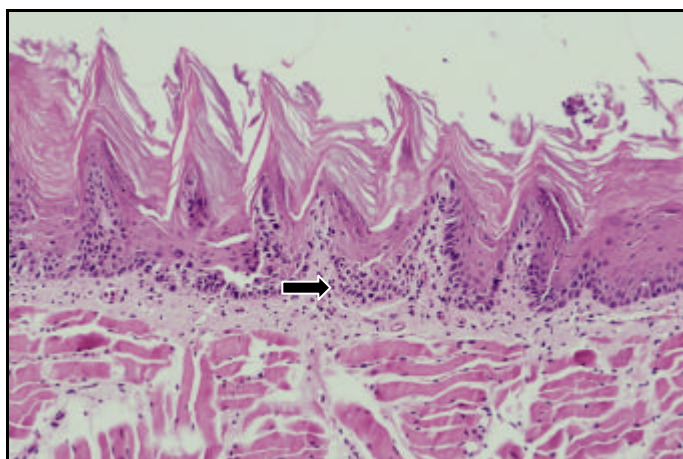


Figura 14 – Microfotografia com perda de estratificação no terço inferior do epitélio de língua – displasia leve a moderada, HE 40X

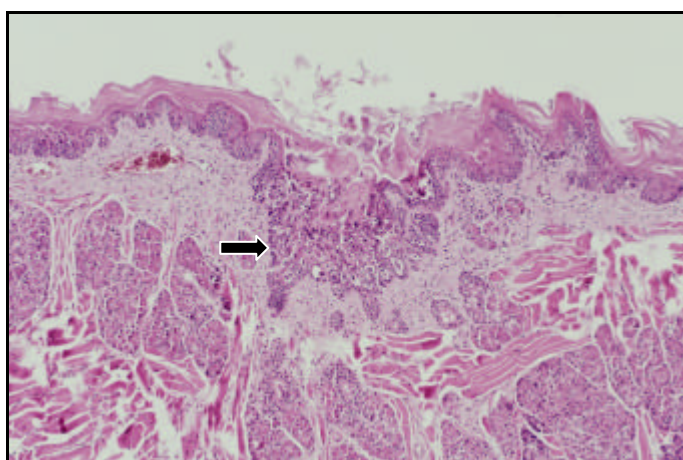


Figura 15 – Microfotografia com perda da estratificação acima de dois terços do epitélio da língua, hiper Cromasia nuclear, alteração da relação do volume núcleo/citoplasma – carcinoma *in situ*, HE 40X

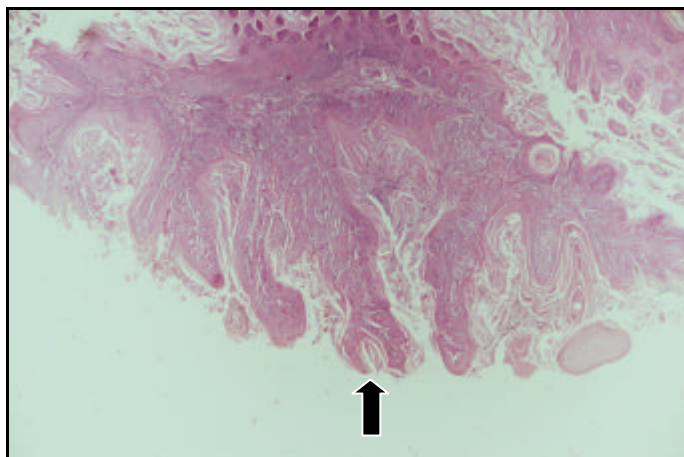


Figura 16 – Microfotografia com carcinoma verrucoso de língua, HE 40X

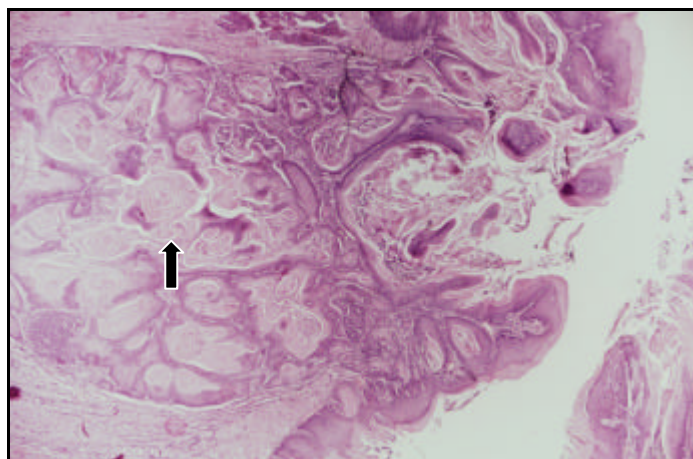


Figura 17 – Microfotografia com CCE bem diferenciado invasor de língua. Pode-se observar intensa formação de pérolas córneas (seta), HE 40X

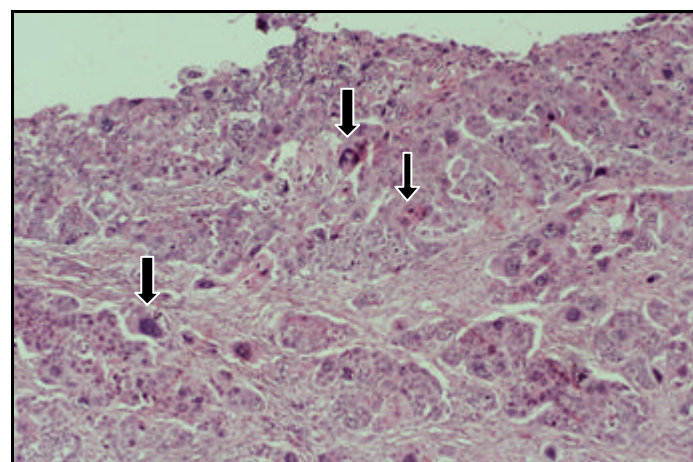


Figura 18 – Microfotografia com CCE pouco diferenciado invasor de língua. Nota-se predomínio de células imaturas e de intensa atividade mitótica (setas), HE 100X

## B) Esôfago

As lesões esofágicas diferiam das de cavidade oral por serem menos invasivas. Em um mesmo esôfago, uma multiplicidade de lesões podia ser vista, com aspectos distintos entre as mesmas.

A maior parte das lesões era de protrusas polipoides (figura 19) e de protrusas tipo platô (figura 20). Lesões superficiais e planas levemente elevadas e planas (figura 21) também podiam ser encontradas. As lesões invasoras de toda a espessura do órgão, via de regra, eram volumosas, localizadas em terços superior, médio ou inferior junto à transição esôfago-gástrica – TEG (figura 22). Alguns casos mostravam duas lesões invasoras no mesmo animal. Na grande maioria, uma multiplicidade de lesões pré-neoplásicas de diferentes aspectos macroscópicos, associadas ou não com lesões invasoras, era o principal achado (figura 23). Além disso, elevações digitiformes, que na microscopia eram traduzidas como papilomas, e lesões verruciformes, traduzidas como carcinoma verrucoso, podiam ser vistas, mas em um número menor de animais (figura 24 e figura 25).

As grandes lesões infiltrativas de esôfago é que, via de regra, levavam o animal ao óbito ou à eutanásia. Alguns apresentavam invasão macroscópica de adventícia, com comprometimento de órgãos torácicos, como pulmões, por invasão direta, formando grandes massas torácicas (figura 26). Na abertura do órgão, dilatação esofágica proximal, associada com tumores ulcerados, deprimidos, com áreas de necrose e estase de ração no tumor, podia ser vista (figura 27).

Interessante observar que, diferentemente da língua, na qual grandes tumores, via de regra, eram invasivos, no esôfago era possível ver grandes lesões exofíticas, verrucosas e estenosantes do órgão, as quais na microscopia traduziam-se como área

de displasia de alto grau, carcinoma verrucoso *in situ* ou carcinoma *in situ*, sem componente invasor (figura 28). Mesmo muitas lesões protrusas tipo polipoide ou platô na microscopia eram, na verdade, lesões pré-neoplásicas (figura 29).

Esta multiplicidade tumoral em um mesmo esôfago, a exemplo do que foi descrito para cavidade oral, não é vista na carcinogênese esofágica humana.

As alterações histopatológicas vistas em esôfago foram assim classificadas:

- Características normais – revestido por epitélio estratificado pavimentoso
- Lesões pré-neoplásicas ou não invasivas:
  - \* Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (hiperqueratose) – HQ e/ou papilomas (P) (figura 30)
  - \* Displasia de baixo grau – DBG (figura 31)
  - \* Displasia de alto grau – DAG (figura 32)
  - \* Carcinoma *in situ* – CIS (figura 33)
- Lesões invasoras ou carcinoma invasor
  - \* Carcinoma verrucoso – CV
  - \* Carcinoma de células escamosas invasor submucoso – CCEIS (figura 34)
  - \* Carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria – CCEIMP (figura 35)
  - \* Carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia – CCEIA (figura 36)

As lesões invasoras podiam apresentar graus variados de diferenciação celular: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.



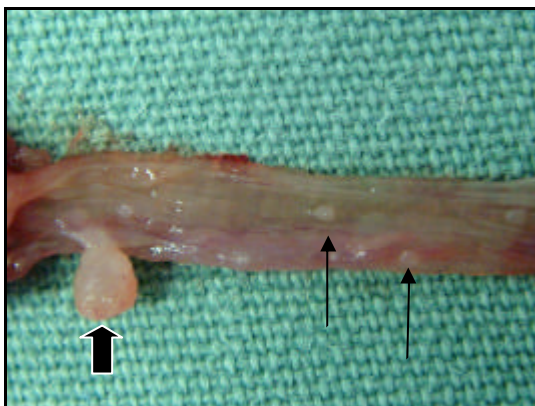


Figura 19 – Lesão protrusa polipóide (seta larga) e lesões planas (setas estreitas) de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma *in situ*

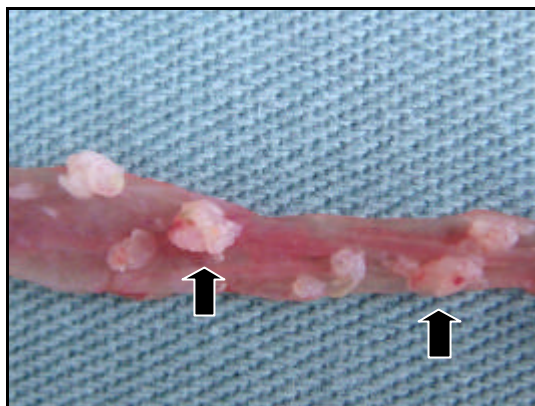


Figura 20 – Lesões protrusas tipo platô de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma *in situ*

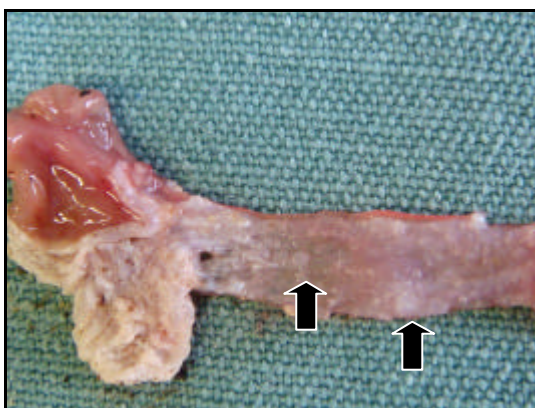


Figura 21 – Lesões planas levemente elevadas de esôfago – lesões displásicas ou carcinoma *in situ*



Figura 22 – CCE de esôfago junto à TEG



Figura 23 – Associação de CCE de esôfago com áreas de displasia e carcinoma *in situ*

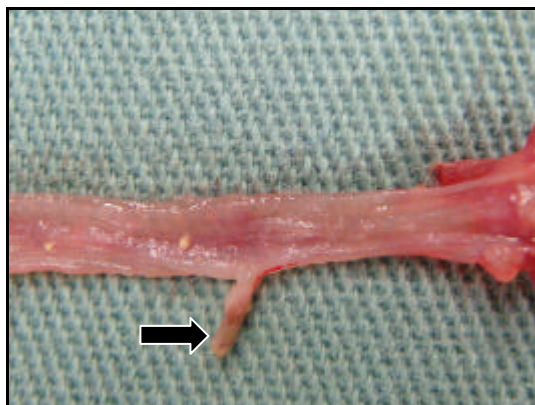


Figura 24 – Papiloma de esôfago



Figura 25 – CCE verrucoso de esôfago

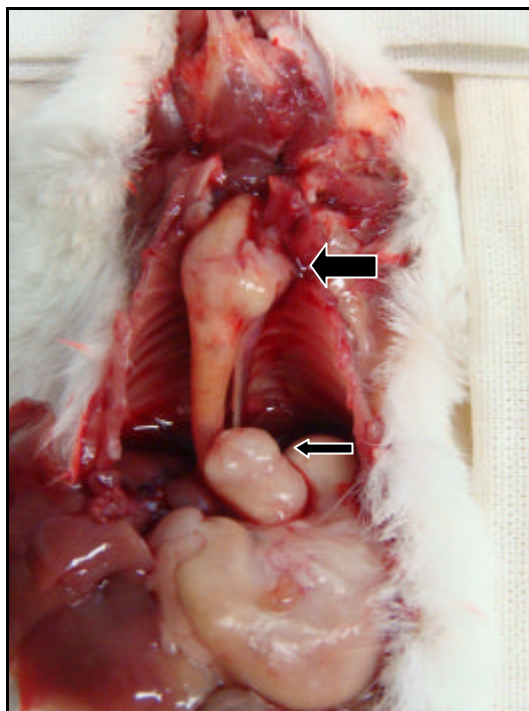


Figura 26 – CCE de esôfago formando uma massa torácica (seta larga) e uma tóraco-abdominal (seta estreita)

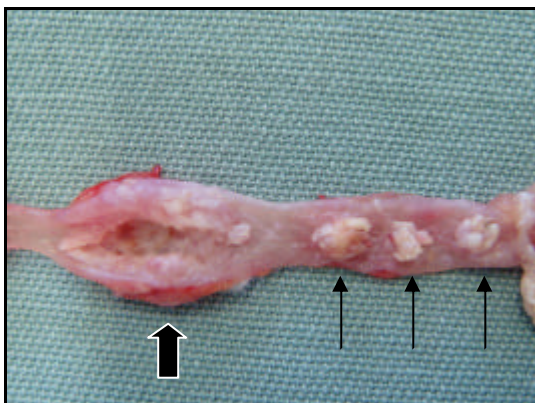


Figura 27 – CCE ulcerado em terço médio de esôfago (seta larga) associado com áreas de carcinoma *in situ* e ou CCE submucoso (setas estreitas)



Figura 28 – Volumosa lesão pré-neoplásica de esôfago – carcinoma *in situ*

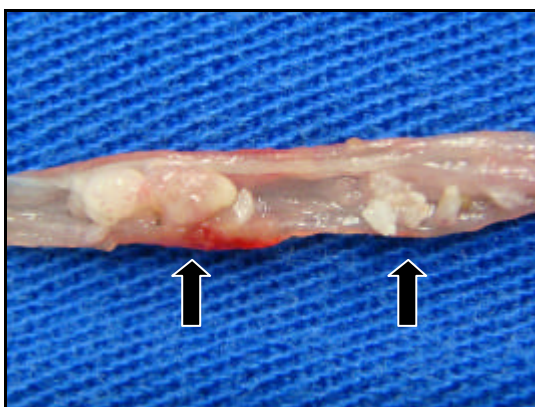


Figura 29 – Lesões pré-neoplásicas de esôfago protrusas polipoides ou protrusas tipo platô



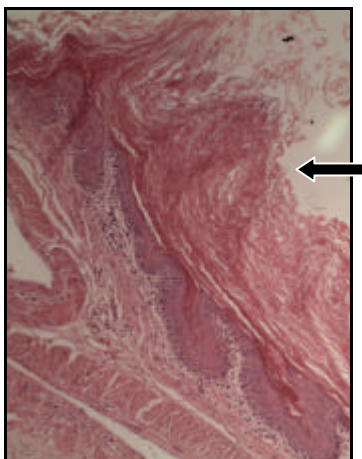


Figura 30 – Microfotografia mostrando hiperqueratose de esôfago, HE 40X

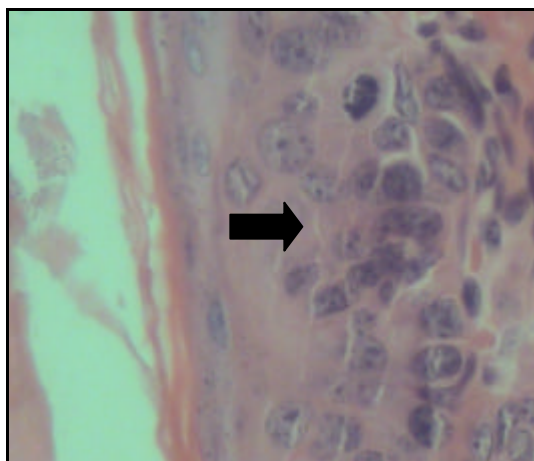


Figura 31 – Microfotografia evidenciando displasia de baixo grau de epitélio esofágico, HE 100X

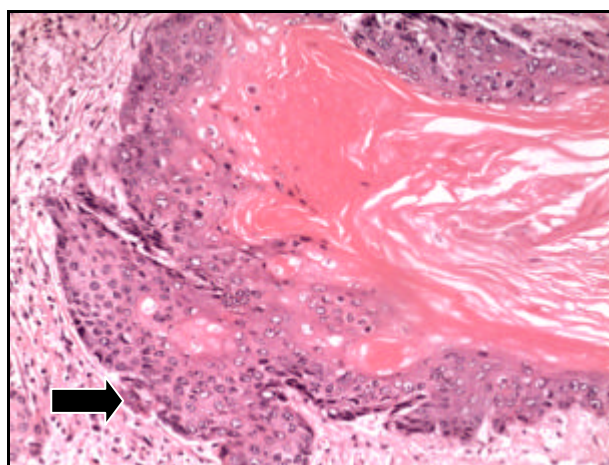


Figura 32 – Microfotografia mostrando displasia de alto grau de esôfago, HE 40X

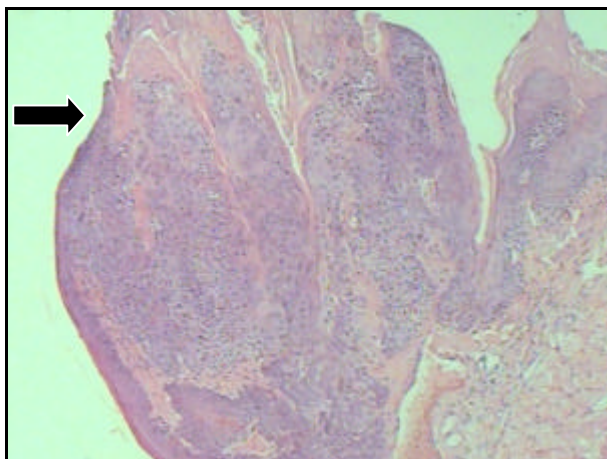


Figura 33 – Microfotografia mostrando lesão polipoide de esôfago com carcinoma *in situ*, HE 40X

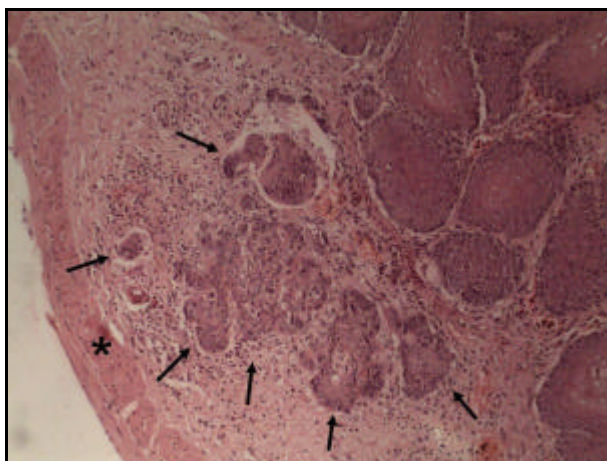


Figura 34 – Microfotografia do epitélio esofágico mostra camada muscular própria (asterisco) preservada e acima blocos tumorais infiltrando a submucosa (setas) – CCE invasor submucoso de esôfago, HE 40X

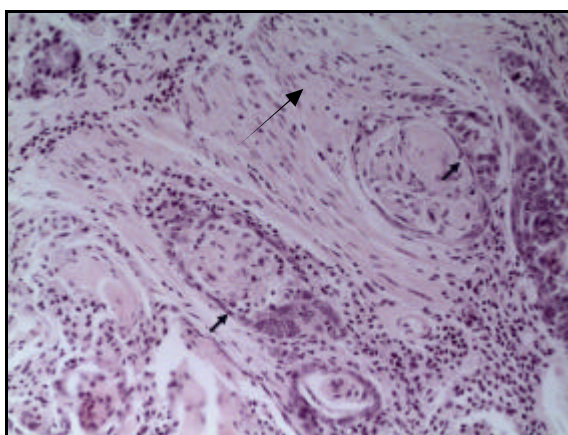


Figura 35: Microfotografia do epitélio esofágico mostra muscular própria (seta longa) invadida por blocos tumorais de CCE (setas curtas) – CCE invasor até a muscular própria do esôfago, HE 100X

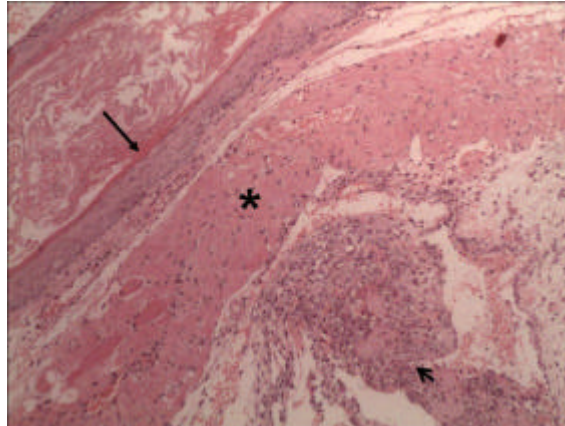


Figura 36: Microfotografia do epitélio esofágico mostra mucosa (seta longa) e muscular (asterisco). Blocos tumorais de CCE na adventícia (seta curta) – CCE invasor até a adventícia, HE 40X

### C) Pré-estômago

Como anteriormente citado, sabe-se que o estômago dos camundongos difere do estômago humano por algumas peculiaridades. A transição esôfago-gástrica (TEG) fica localizada abaixo do hiato esofágico do diafragma. Assim, diferentemente dos humanos, o esfíncter esofágico inferior não coincide com o pinçamento diafragmático, existindo um segmento maior de esôfago abdominal.

O estômago do camundongo é dividido em pré-estômago ou antro cardíaco e estômago propriamente dito ou glandular ou antro pilórico. Existe uma tênue linha de tecido estratificado pavimentoso separando os dois antros, o que é nítido à macroscopia (figuras 37 e 38).

O pré-estômago é uma continuação do esôfago. Também considerado uma câmara de armazenamento de alimento; seu epitélio de revestimento estratificado pavimentoso é semelhante e contíguo ao do esôfago, revestindo quase a metade do estômago em seu fundo e grande curvatura (figura 39). Um segmento do epitélio da transição esôfago-gástrico, na verdade, é uma continuação do epitélio esofágico, que avança para dentro do pré-estômago (figura 40).

O estômago propriamente dito ou antro pilórico apresenta epitélio de revestimento glandular similar ao epitélio de revestimento gástrico humano.

Em função da similaridade do epitélio do pré-estômago com o do restante da VADS, o antro cardíaco também é suscetível à carcinogênese induzida pelo 4-NQO. Apesar de ser a localização mais infrequente de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas invasoras, em comparação à cavidade oral e esôfago, um número pequeno de animais desenvolveu tumores invasores no pré-estômago, via de regra, associado com tumores em outros setores da mucosa da VADS.

Parte das lesões gástricas estava localizada em fundo gástrico (figura 41) ou junto à transição esôfago-gástrica (figura 42). Quando a lesão tumoral localizava-se nesta, ela era tida como esofágica, já que a transição era amostrada juntamente com o esôfago. A peça era seccionada logo abaixo da tênue linha branca de transição esôfago-gástrica e lesões localizadas abaixo desta eram amostradas no pré-estômago, portanto, pertencentes a este órgão. A grande maioria das lesões pré-neoplásicas localizava-se neste setor, com componente esofágico, com componente na transição dos órgãos e com componente gástrico. A lesão era tida como esofágica e gástrica. Não eram vistas lesões pré-neoplásicas em fundo gástrico exclusivamente.

As lesões invasoras e ulceradas de pré-estômago quase sempre comprometiam a serosa de quase todo o órgão, invadindo por contiguidade o antro pilórico (figura 43). Apresentações mais brandas de câncer gástrico, como as com invasão de submucosa, ausência de invasão de serosa, ausência de disseminação celomática ou à distância, e localizadas em TEG, como se fosse uma lesão proveniente do esôfago com invasão da mesma e de parte do pré-estômago, foram vistas em poucos animais (figura 44).

Em decorrência das lesões pré-neoplásicas estarem em sua grande maioria no TEG e, assim, serem amostradas como esofágicas, e da escassez de lesões pré-neoplásicas isoladas de pré-estômago, optou-se por classificar as lesões deste setor como invasivas ou não invasivas, sem subclassificá-las. Desta forma, as lesões gástricas (pré-estômago) foram classificadas na microscopia como:

- Características normais – epitélio estratificado pavimentoso
- Lesões pré-neoplásicas ou não invasivas ou ausência de carcinoma invasor (engloba epitélio normal, hiperqueratoses, displasias, carcinoma *in situ*)
- Carcinoma invasor (engloba carcinoma verrucosos e os francamente invasores - figura 45 - das camadas histológicas do pré-estômago)

As lesões invasoras podiam se apresentar com graus variados de diferenciação celular: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.

Nas tabelas que se seguem nos resultados, as porcentagens de carcinoma gástrico invasor ausente correspondem ao grupo de epitélio com características normais e ao grupo de lesões pré-neoplásicas ou não invasivas.

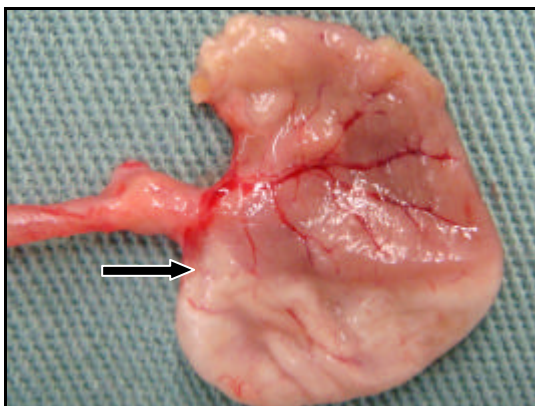


Figura 37 – Linha de separação entre os antros do estômago de camundongos (seta)

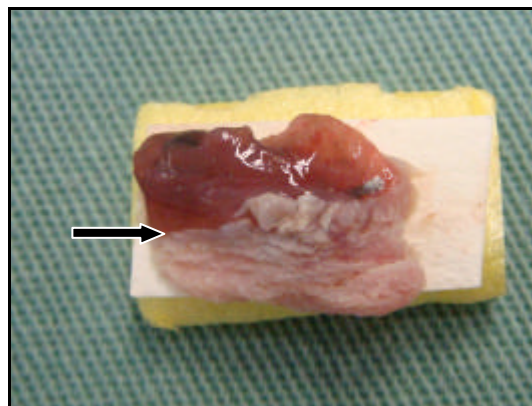


Figura 38 – Separação dos epitélios do estômago de camundongos (seta)



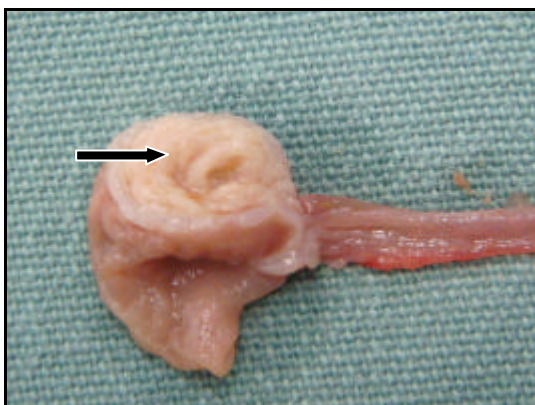


Figura 39 – Epitélío de revestimento do pré-estômago (fundo) é semelhante ao esôfago (seta)

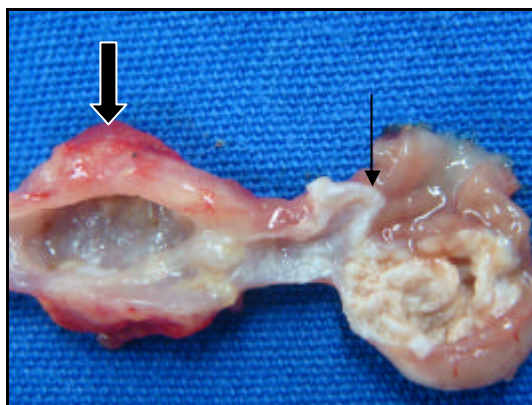


Figura 40 – Visão anatômica da TEG (seta estreita) com volumoso CCE esofágico à esquerda (seta larga)

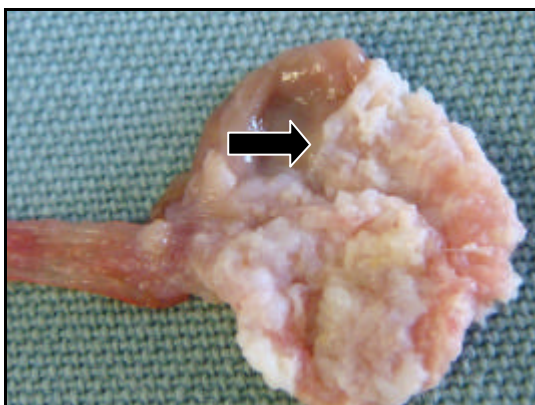


Figura 41 – CCE do pré-estômago (fundo) com invasão de antro pilórico (seta)

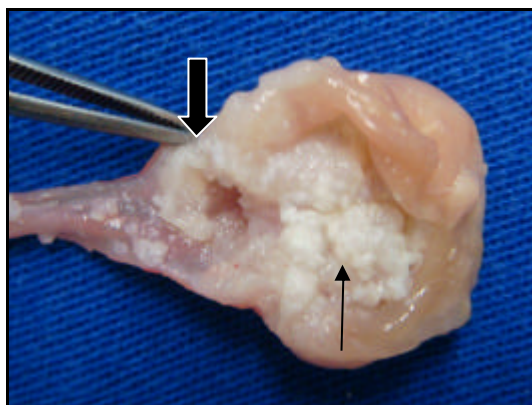


Figura 42 – CCE de TEG com componente esofágico (seta larga) e com componente gástrico (seta estreita)

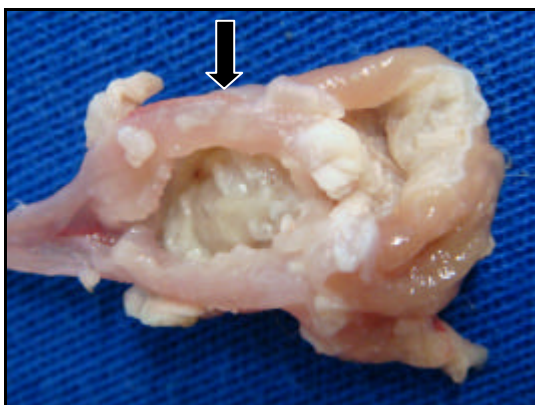


Figura 43 – CCE gástrico com invasão de serosa (seta)

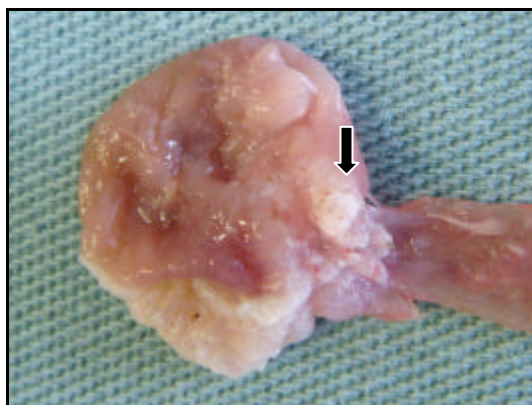


Figura 44 – Apresentação inicial de CCE em área de TEG com comprometimento gástrico (seta)

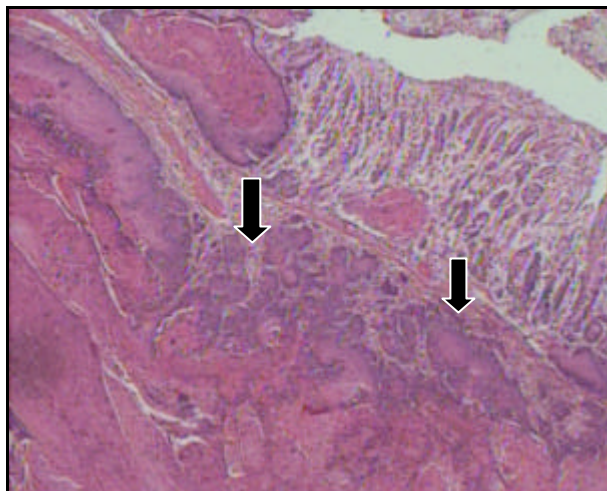


Figura 45: CCE gástrico (setas) com invasão de toda a parede do órgão, HE 40X

### 4.3 Estudo da evolução da carcinogênese no período entre a ausência de lesões macroscópicas e o início do aparecimento das lesões invasoras

Grande parte dos trabalhos publicados que estudaram a carcinogênese da VADS induzida pelo 4NQO documentou que nenhuma lesão em cavidade oral é aparente com o término da indução tumoral (figuras 56, 57, 58).

Neste trabalho, no grupo 4NQO 50, 3 a 4 animais por caixa (n = 8) foram aleatoriamente escolhidos e anestesiados semanalmente com isoflurane para avaliação da língua, iniciando na semana seguinte ao término da indução tumoral com 4NQO. Nenhuma lesão macroscópica foi encontrada até por volta da oitava semana após o término da indução tumoral, quando as primeiras lesões orais podiam ser documentadas (figura 48).

Era interessante saber o que ocorria no período entre o término da indução e o início do aparecimento das lesões pré-neoplásicas (oitava semana), do ponto de vista da microscopia; bem como o período de tempo de evolução destas lesões pré-invasoras até tornarem-se invasoras (por volta da décima sexta semana).

Para isto foi criado um grupo composto por 20 animais, que foram distribuídos em quatro caixas de 5, submetidos à indução tumoral por oito semanas com 50 µg/ml de 4-NQO na água. Da primeira à décima quinta semanas, após o término da indução tumoral com 4-NQO, um a dois animais eram escolhidos aleatoriamente das caixas e eutanasiados em intervalos de 7 a 14 dias.

A tabela 2 correlaciona a semana da eutanásia contada a partir do término da indução tumoral, com a presença ou não de lesões macroscópicas, e sua correlação com a microscopia (a cor da semana da eutanásia correlaciona-se com a cor da microscopia do esôfago):



Tabela 2 – Macroscopia e microscopia dos animais do estudo da evolução da carcinogênese

Camundongo	Semana da eutanásia	Macroscopia	Microscopia da língua	Microscopia do esôfago	Microscopia do pré-estômago
1	1º	Tumor ausente	Normal	Normal	Normal
2	1º	Tumor ausente	Normal	Normal	Normal
3	2º	Tumor ausente	Normal	Normal	Hiperqueratose
4	3º	Tumor ausente	Normal	Displasia de baixo grau	Normal
5	3º	Diminutas tumorações esofágicas	Normal	Displasia de baixo grau	Normal
6	4º	Diminutas tumorações em língua posterior e esôfago	Hiperplasia epitelial	Hiperqueratose	Normal
7	4º	Pequeno tumor de esôfago	Hiperqueratose	Displasia de baixo grau	Normal
8	5º	Diminutas tumorações em língua	Carcinoma <i>in situ</i>	Displasia de baixo grau	Normal
9	6º	Pequenos tumores em esôfago	Hiperqueratose	Displasia de baixo grau	Normal
10	6º	Pequenos tumores de esôfago	Normal	Displasia de alto grau	Normal
11	6º	Tumor ausente	Hiperqueratose	Normal	Normal
12	7º	Pequeno tumor de esôfago	Hiperqueratose	Carcinoma <i>in situ</i>	Normal
13	8º	Pequenos tumores em ponta de língua e esôfago	Carcinoma <i>in situ</i>	Displasia de baixo grau	Normal
14	9º	Tumor bem aparente em língua e esôfago	Carcinoma <i>in situ</i>	Displasia de alto grau	Normal
15	9º	Pequeno tumor em esôfago	Hiperqueratose	Displasia de alto grau	Normal
16	12º	Tumor ausente	Hiperqueratose	Normal	Normal
17	12º	Tumor de língua e volumoso de esôfago	Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma <i>in situ</i>	Normal
18	14º	Múltiplos tumores de esôfago	Hiperplasia epitelial	Carcinoma <i>in situ</i>	Normal
19	15º	Tumores volumosos de esôfago	Displasia discreta a moderada	Carcinoma invasor submucoso	Normal
20	15º	Volumosos tumores de língua e esôfago	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor submucoso	Normal

Logo após o término da indução tumoral, nenhuma lesão macroscópica é visível no grupo 4NQO 50 (figuras 56, 57, 58). Pode-se observar que a grande maioria das lesões torna-se bem aparente da oitava a nona semanas e que são pré-neoplásicas – figura 49 (cor laranja). Observa-se também que as primeiras lesões invasoras surgem na décima quinta semana do estudo – figuras 52, 53, 54 (cor marrom).

Lesões medindo até 1,5 mm, tidas como diminutas (cor vermelha), podiam ser vistas em esôfago já por volta da terceira semana, após o término da indução tumoral com 4-NQO. As primeiras lesões diminutas em língua apareceram por volta da quarta semana, talvez apenas aparentes, pelo exame detalhado de toda extensão do órgão, possível apenas com a retirada completa dele (camundongo 6 – figura 46) e como pôde ser também visto com o camundongo 17 – figura 55 – eutanasiado na décima segunda semana.

As lesões tidas como pequenas, medindo de 1,5 mm até 5 mm (cor roxa), já eram visíveis em esôfago por volta da quarta semana (camundongo 7, figura 47) e em língua por volta da oitava semana (camundongo 13, figura 48).

As lesões tidas como bem aparentes ou maiores de 5 mm (cor laranja) que dificilmente passariam despercebidas, no exame da cavidade oral com o animal anestesiado, a não ser que muito posteriores, eram passíveis de visibilização por volta da oitava e nona semanas (camundongo 14, figura 49).

Tumores volumosos estenosantes de esôfago (camundongo 17, figura 50) e até os múltiplos (camundongo 18, figura 51) podiam ser vistos a partir da décima segunda semana. Todos pré-neoplásicos.

Na microscopia, pode-se observar que, neste grupo em específico, as primeiras lesões pré-neoplásicas da língua predominam por volta da oitava semana após o término da indução tumoral. As primeiras lesões invasoras de língua (cor marrom) puderam ser vistas próximo das dezesseis semanas de seguimento (camundongo 20, figura 52).

A carcinogênese esofágica mostrou-se mais lógica no grupo em questão, face à sequência esperada de evolução da carcinogênese estar mais nítida, com os primeiros casos de displasia de baixo grau aparecendo por volta da terceira semana e predominando até a sexta (cor lilás); as displasias de alto grau predominando da sexta a nona semanas (cor azul); os carcinoma *in situ* aparecendo a partir da décima segunda semana (cor verde claro) e os primeiros invasores (camundongos 19 e 20, figuras 53 e 54) a partir da décima quinta e sexta semanas (cor marrom) após o término da indução tumoral de oito semanas com 4-NQO 50.



Figura 46 – Diminuta lesão posterior pré-neoplásica em língua (seta) na quarta semana do camundongo 6

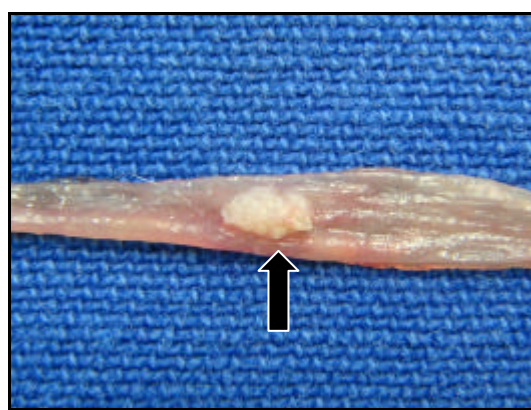


Figura 47 – Pequena lesão esofágica pré-neoplásica (seta) na quarta semana do camundongo 7



Figura 48 – Pequena lesão pré-neoplásica em língua (seta) vista em camundongo 13 anestesiado na oitava semana

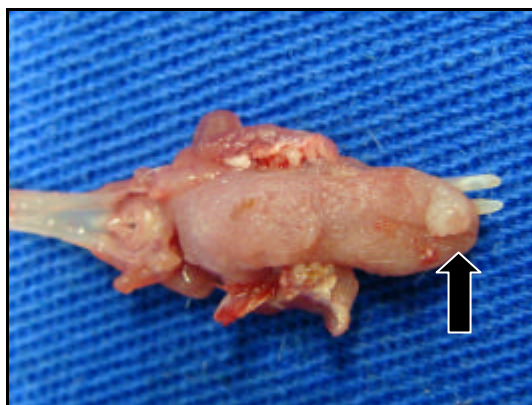


Figura 49 – Lesão aparente pré-neoplásica em língua (seta) na nona semana do camundongo 14



Figura 50 – Carcinoma *in situ* de esôfago estenosante (seta) na décima segunda semana do camundongo 17

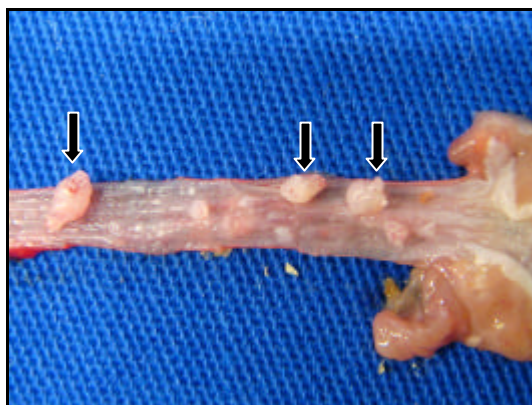


Figura 51 – Vários carcinomas *in situ* de esôfago (setas) na décima quarta semana do camundongo 18

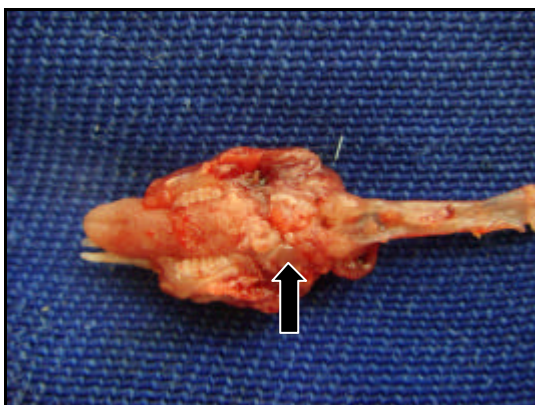


Figura 52 – CCE de língua (seta) na décima quinta semana do camundongo 20

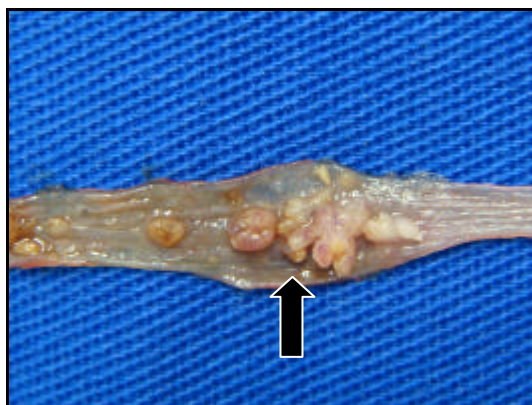


Figura 53 – CCE submucoso de esôfago (seta) na décima quinta semana do camundongo 19



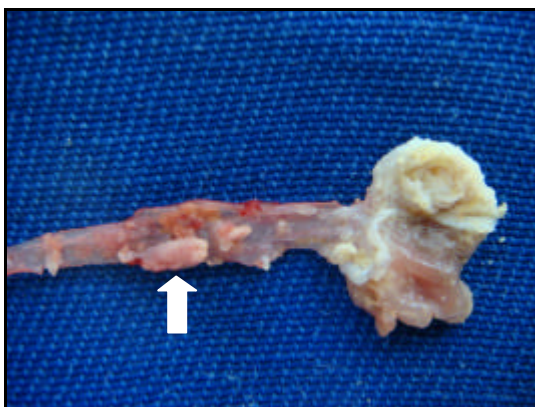


Figura 54 – CCE submucoso de esôfago (seta) na décima quinta semana do camundongo 20

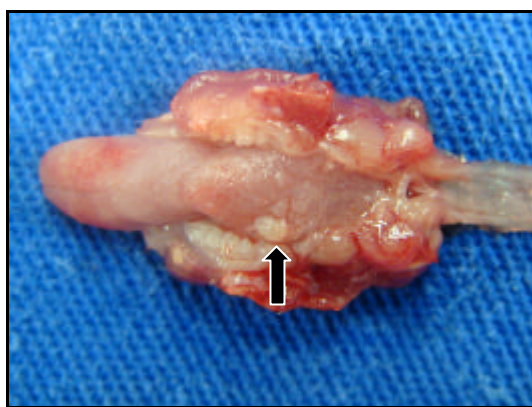


Figura 55 – Lesão posterior pré-neoplásica em língua (seta) na décima segunda semana do camundongo 17



Figura 56 – Aspecto normal da língua na primeira semana após o término da indução tumoral



Figura 57 – Aspecto normal do esôfago na primeira semana após o término da indução tumoral



Figura 58 – Aspecto normal do estômago na primeira semana após o término da indução tumoral

#### 4.4 Análise da incidência de neoplasias invasoras da VADS

As tabelas que se seguem neste item mostram a incidência de carcinomas invasores em cada órgão da VADS divididos de acordo com o agente de quimioprevenção utilizado. Foi contabilizado apenas um carcinoma invasor por sítio, nos casos onde mais de um estava presente.

Para cavidade oral, o diagnóstico de carcinoma invasor foi dado ao animal que apresentasse pelo menos um dos seguintes diagnósticos: carcinoma verrucoso (CV) e/ou carcinoma de células escamosas superficialmente invasor (CCESI) e/ou carcinoma de células escamosas invasor (CCEI) e/ou carcinoma mucoepidermoide (CM). A incidência das lesões pré-neoplásicas foi computada apenas quando as francamente invasoras não eram vistas, por motivos anteriormente expostos em métodos, e correspondem às seguintes: hiperplasia epitelial – HE e/ou hiperqueratose – HQ e/ou displasia leve a moderada – DDM e/ou carcinoma *in situ* – CIS.

Para o esôfago, o diagnóstico de carcinoma invasor foi dado ao animal que apresentasse pelo menos um dos seguintes diagnósticos: carcinoma verrucoso (CV) e/ou carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS) e/ou carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria (CCEIMP) e/ou carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia (CCEIA). Traz, também, a incidência das lesões pré-neoplásicas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas: hiperplasia epitelial e/ou hiperqueratose e/ou papiloma (HE/HQ/P) e/ou displasia de baixo grau – DBG e/ou displasia de alto grau – DAG e/ou carcinoma *in situ* – CIS.

Para as lesões encontradas em pré-estômago não foi realizada subclassificação, em decorrência da escassez de lesões pré-neoplásicas isoladas e da menor variedade de lesões invasoras. Assim, nas tabelas, procurou-se focar apenas na presença ou

ausência de neoplasia gástrica invasora. Os valores referentes à ausência de neoplasia gástrica invasora contabilizam, em sua grande maioria, pré-estômago com características normais, em decorrência dos poucos casos de lesões pré-neoplásicas vistas isoladamente. Já as lesões invasoras compreendem aquelas que foram diagnosticadas como carcinoma verrucoso (CV) e/ou carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS) e/ou carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria (CCEIMP) e/ou carcinoma de células escamosas invasor até a serosa (CCEISE). Traz, também, a incidência das lesões pré-neoplásicas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas: hiperplasia epitelial – HE e/ou hiperqueratose – HQ e/ou displasia de baixo grau – DBG e/ou displasia de alto grau – DAG e/ou carcinoma *in situ* – CIS.

Apesar de parte dos carcinomas verrucosos serem *in situ*, sua colocação no grupo de lesões invasoras decorre do fato de ser tido como uma variante anatomo-clínica do carcinoma de células escamosas. Além do mais, apesar de ser uma lesão *borderline*, de comportamento brando, mas “intimidador” quando diagnosticado na prática médica é, via de regra, tratado como um câncer e não como uma lesão *in situ*.

#### **4.4.1 Incidências de neoplasias da VADS entre grupos submetidos ou não à quimioprevenção com óleo de peixe**

##### **A) Cavidade oral**

A tabela 3 traz a incidência de carcinomas de cavidade oral invasores na comparação entre o grupo 4NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe a 10%.

Tabela 3 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos I e II

<b>Carcinoma invasor da cavidade oral</b>			
<b>Grupos (n)</b>	<b>Presente n (%)</b>	<b>Ausente n (%)</b>	<b>P</b>
4-nqo 100 (18)	14 (77,7)	4 (22,2)	1,00
4-nqo 100 → op 10% (20)	16 (80,0)	4 (20)	

Aplicando-se o teste exato de Fisher, observou-se que não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de cavidade oral entre os animais que receberam 100 µg/ml de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO, seguida de quimioprevenção com 10% de óleo de peixe ( $p = 1,00$ ).

A tabela 4 mostra a incidência de carcinoma invasor oral vista nos grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe 5% em diferentes fases da carcinogênese.

Tabela 4 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos VIII, X e XI

<b>Carcinoma invasor da cavidade oral</b>			
<b>Grupos (n)</b>	<b>Presente n (%)</b>	<b>Ausente n (%)</b>	<b>P</b>
4-nqo 50 (37)	27 (72,9)	10 (27)	0,34
4-nqo 50 → op 5% (19)	16 (84,2)	3 (15,7)	
4-nqo 50 + op 5% → op 5% (17)	11 (64,7)	6 (35,2)	



Aplicando-se o teste de  $\chi^2$ , observou-se que não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de cavidade oral entre os animais que receberam 50  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 5% de óleo de peixe ou os que receberam quimioprevenção com óleo de peixe a 5% não somente após a indução tumoral, mas também durante a fase de iniciação ( $p = 0,34$ ).

As alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral, especialmente em língua, localização preferencial da maioria das lesões de boca, foram graduadas de acordo com a evolução das mesmas no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior. A tabela 5 mostra esta distribuição, de acordo com os grupos 4-NQO 100, e a tabela 6 mostra esta distribuição de acordo com os grupos 4-NQO 50, sem e com quimioprevenção com diferentes concentrações de óleo de peixe.

Tabela 5 – Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 10%, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral

Anatomia patológica	4-nqo 100 n (%)	4-nqo 100 → op 10% n (%)
HE e/ou HQ	2 (11,1)	3 (15,0)
DDM	1 (5,5)	1 (5,0)
CIS	1 (5,5)	0 (0,0)
<b>CV</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>3 (15,0)</b>
<b>CCESI</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>2 (10,0)</b>
<b>CCEI</b>	<b>12 (66,6)</b>	<b>11 (55,0)</b>

**Legenda:** Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ); displasia discreta a moderada (DDM); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas superficialmente invasor (CCESI); carcinoma de células escamosas invasor (CCEI)

Tabela 6 – Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 5%, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral

Anatomia patológica	4-nqo 50 n (%)	4-nqo 50 → op 5% n (%)	4-nqo 50 + op 5% → op 5% n (%)
HE e/ou HQ	4 (10,8)	1 (5,2)	2 (11,7)
DDM	1 (2,7)	0 (0,0)	2 (11,7)
CIS	5 (13,5)	2 (10,5)	2 (11,7)
<b>CV</b>	<b>5 (13,5)</b>	<b>2 (10,5)</b>	<b>0 (0,0)</b>
<b>CCESI</b>	<b>2 (5,4)</b>	<b>3 (15,7)</b>	<b>4 (23,5)</b>
<b>CCEI</b>	<b>20 (54,5)</b>	<b>11 (57,8)</b>	<b>6 (35,2)</b>
<b>CM</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>1 (5,8)</b>

**Legenda:** Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ); displasia discreta a moderada (DDM); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas superficialmente invasor (CCESI); carcinoma de células escamosas invasor (CCEI); carcinoma mucoepidermoide (CM)

Pode-se observar um predomínio das lesões invasoras nas tabelas 5 e 6 (em negrito), com uma distribuição muito semelhante entre os diferentes grupos. As lesões pré-neoplásicas foram computadas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas.

## B) Esôfago

A tabela 7 mostra a incidência de carcinoma esofágico invasor visto entre os grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe a 10%.

Tabela 7 – Incidência de carcinoma invasor do esôfago nos grupos I e II

Grupos (n)	Carcinoma esofágico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 100 (18)	10 (55,5)	8 (44,4)	0,73
4-nqo 100 → op 10% (20)	10 (50,0)	10 (50,0)	

Aplicando o teste de  $\chi^2$ , observa-se que não há diferença estatisticamente significativa da incidência de neoplasias invasoras de esôfago entre os animais que

receberam 100 µg/ml de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 10% de óleo de peixe ( $p = 0,73$ ).

A tabela 8 traz a incidência de carcinoma esofágico invasor entre os grupos 4-NQO 50 submetidos ou não à quimioprevenção com óleo de peixe 5% em diferentes fases da carcinogênese.

Tabela 8 – Incidência de carcinoma esofágico invasor nos grupos VIII, X e XI

Grupos (n)	Carcinoma esofágico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 50 (37)	14 (37,8)	23 (62,1)	0,02
4-nqo 50 → op 5% (19)	13 (68,4)	6 (31,5)	
4-nqo 50 + op 5% → op 5% (17)	5 (29,4)	12 (70,5)	

Novamente, aplicando-se o teste de  $\chi^2$ , observou-se que na análise entre os grupos há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de esôfago entre os animais que receberam 50 µg/ml de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 5% de óleo de peixe ou os que receberam quimioprevenção com óleo de peixe a 5% não somente após a indução tumoral, mas também durante a fase de iniciação ( $p=0,02$ ).

Para avaliar quais grupos diferiam entre si, foi aplicado o mesmo teste acima, comparando grupo a grupo. Observou-se que o grupo que diferia dos demais era o que recebeu 4-NQO 50 → OP 5%.

Em decorrência de uma incidência elevada de neoplasia invasora esofágica no grupo 4-NQO 50 → OP 5% (68,4%), em comparação com o grupo 4-NQO 50 (37,8%), o valor de  $p$  foi de 0,01, estatisticamente significativa.

Na comparação do grupo 4-NQO 50 → OP 5% com o grupo 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5%, a diferença também foi estatisticamente significativa, com valor de p de 0,02, em decorrência da menor incidência de neoplasia esofágica invasora neste grupo (29,4%) em comparação com aquele (68,4%).

Na comparação entre os grupos 4-NQO 50 e 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5%, cujas incidências de neoplasia invasora de esôfago foram, respectivamente, 37,8% e 29,4%, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,71$ ).

As alterações anatomopatológicas vistas em esôfago foram graduadas de acordo com a evolução das mesmas no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior. A tabela 9 mostra esta distribuição, de acordo com os grupos 4-NQO 100, e a tabela 10 mostra esta distribuição de acordo com os grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes concentrações.

Tabela 9 – Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 10%, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago

Anatomia patológica	4-nqo 100 N (%)	4-nqo 100 → op 10% n (%)
CN	1 (5,5)	0 (0,0)
HE e/ou HQ e/ou P	3 (16,6)	1 (5,0)
DBG	1 (5,5)	1 (5,0)
DAG	1 (5,5)	3 (15,0)
CIS	2 (11,1)	5 (25,0)
<b>CV</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>0 (0,0)</b>
<b>CCEIS</b>	<b>4 (22,2)</b>	<b>7 (35,0)</b>
<b>CCEIMP</b>	<b>1 (5,5)</b>	<b>2 (10,0)</b>
<b>CCEIA</b>	<b>3 (16,6)</b>	<b>1 (5,0)</b>

**Legenda:** Característica normal (CN); hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ) e/ou papilomas (P); displasia de baixo grau (DBG); displasia de alto grau (DAG); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS); carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria (CCEIMP); carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia (CCEIA)

Tabela 10 – Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com óleo de peixe 5%, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago

Anatomia patológica	4-nqo 50 n (%)	4-nqo 50 → op 5% n (%)	4-nqo 50 + op 5% → op 5% n (%)
HE e/ou HQ e/ou P	2 (5,4)	1 (5,2)	0 (0,0)
DBG	3 (8,1)	0 (0,0)	2 (11,7)
DAG	6 (16,2)	0 (0,0)	6 (35,2)
CIS	12 (32,4)	5 (26,3)	4 (23,5)
<b>CV</b>	<b>1 (2,7)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>
<b>CCEIS</b>	<b>9 (24,3)</b>	<b>8 (42,1)</b>	<b>5 (29,4)</b>
<b>CCEIA</b>	<b>4 (10,8)</b>	<b>5 (26,3)</b>	<b>0 (0,0)</b>

**Legenda:** Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ) e/ou papilomas (P); displasia de baixo grau (DBG); displasia de alto grau (DAG); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS); carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia (CCEIA)

Pode-se observar nas tabelas 9 e 10 uma distribuição mais equalitária das lesões invasoras (em negrito) com as não invasoras ao comparar com a mesma tabela feita para a cavidade oral. Isto mostra que a carcinogênese esofágica é mais dificilmente obtida neste modelo do que a oral. As lesões pré-neoplásicas foram computadas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas.

### C) Pré-estômago

A tabela 11 traz a incidência de neoplasia gástrica invasora na comparação dos grupos 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe 10%. Não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasia gástrica na comparação entre os animais pertencentes ao grupo 4-NQO 100 com o que realizou a mesma dose de 4-NQO seguida de quimioprevenção com óleo de peixe 10% ( $p = 0,59$ ) – teste exato de Fisher.

Tabela 11 – Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos I e II

Grupos (n)	Carcinoma gástrico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 100 (18)	2 (11,1)	16 (88,8)	0,59
4-nqo 100 → op 10% (20)	1 (5,0)	19 (95,0)	

Entre os animais pertencentes aos grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe 5% em diferentes fases da carcinogênese não houve significância estatística entre as incidências de carcinoma gástrico invasor ( $p=0,88$ ) – teste exato de Fisher – tabela 12.

Tabela 12 – Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos VIII, X e XI

Grupos (n)	Carcinoma gástrico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 50 (37)	5 (13,5)	32 (86,4)	0,88
4-nqo 50 → op 5% (19)	2 (10,5)	17 (89,4)	
4-nqo 50 + op 5% → op 5% (17)	1 (5,8)	16 (94,1)	

#### 4.4.2 Incidência de neoplasias da VADS entre grupos submetidos ou não à quimioprevenção com pioglitazone

##### A) Cavidade oral

A tabela 13 traz a incidência de carcinomas de cavidade oral invasores na comparação entre o grupo 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm.

Tabela 13 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos I e III

<b>Carcinoma invasor da cavidade oral</b>			
<b>Grupos (n)</b>	<b>Presente n (%)</b>	<b>Ausente n (%)</b>	<b>P</b>
4-nqo 100 (18)	14 (77,7)	4 (22,2)	0,27
4-nqo 100 → ppar 300 (18)	11 (61,1)	7 (38,8)	

Aplicando-se o teste de  $\chi^2$ , observou-se que não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de cavidade oral entre os animais que receberam 100  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 300 ppm de pioglitazone ( $p = 0,27$ ).

A tabela 14 mostra a incidência de carcinoma oral invasor entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com 100 ppm de pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese.

Tabela 14 – Incidência de carcinoma oral invasor nos grupos VIII, XII e XIII

<b>Carcinoma invasor da cavidade oral</b>			
<b>Grupos (n)</b>	<b>Presente n (%)</b>	<b>Ausente n (%)</b>	<b>P</b>
4-nqo 50 (37)	27 (72,9)	10 (27)	0,63
4-nqo 50 → ppar 100 (21)	16 (76,1)	5 (23,8)	
4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100 (17)	10 (62,5)	7 (37,5)	

Aplicando-se o teste de  $\chi^2$ , observou-se que não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de cavidade oral entre os animais que receberam 50  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 100 ppm de pioglitazone ou os que receberam quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm não somente após a indução tumoral mas também durante a fase de iniciação ( $p = 0,63$ ).

As alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral, especialmente em língua, localização preferencial da maioria das lesões de boca, foram graduadas de acordo com a evolução das mesmas no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior. A tabela 15 mostra esta distribuição, de acordo com os grupos 4-NQO 100, e a tabela 16 mostra esta distribuição de acordo com os grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone, em diferentes concentrações.

Tabela 15 – Distribuição nos grupos 4NQO 100, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral

Anatomia patológica	4-nqo 100 n (%)	4-nqo 100 → ppar 300 n (%)
HE e/ou HQ	2 (11,1)	4 (22,2)
DDM	1 (5,5)	1 (5,5)
CIS	1 (5,5)	2 (11,1)
CV	<b>0 (0,0)</b>	<b>2 (11,1)</b>
CCESI	<b>2 (11,1)</b>	<b>2 (11,1)</b>
CCEI	<b>12 (66,6)</b>	<b>7 (38,8)</b>

**Legenda:** Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ); displasia discreta a moderada (DDM); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas superficialmente invasor (CCESI); carcinoma de células escamosas invasor (CCEI)



Tabela 16 – Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral

Anatomia patológica	4-nqo 50 n (%)	4-nqo 50 → ppar 100 n (%)	4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100 n (%)
CN	0 (0,0)	2 (9,5)	2 (12,5)
HE e/ou HQ	4 (10,8)	1 (4,7)	2 (12,5)
DDM	1 (2,7)	2 (9,5)	1 (6,2)
CIS	5 (13,5)	0 (0,0)	1 (6,2)
<b>CV</b>	<b>5 (13,5)</b>	<b>4 (19,0)</b>	<b>4 (25,0)</b>
<b>CCESI</b>	<b>2 (5,4)</b>	<b>1 (4,7)</b>	<b>1 (6,2)</b>
<b>CCEI</b>	<b>20 (54,5)</b>	<b>11 (52,3)</b>	<b>5 (31,2)</b>

**Legenda:** Característica normal (CN); hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ); displasia discreta a moderada (DDM); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas superficialmente invasor (CCESI); carcinoma de células escamosas invasor (CCEI)

Pode-se observar um predomínio das lesões invasoras nas tabelas 15 e 16 (em negrito), com uma distribuição muito semelhante entre os diferentes grupos. As lesões pré-neoplásicas foram computadas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas.

## B) Esôfago

A tabela 17 mostra a incidência de carcinoma esofágico invasor visto entre os grupos 4-NQO 100 com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm.

Tabela 17 – Incidência de carcinoma invasor de esôfago nos grupos I e III

Grupos (n)	Carcinoma esofágico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 100 (18)	10 (55,5)	8 (44,4)	0,73
4-nqo 100 → ppar 300 (18)	9 (50)	9 (50)	

Aplicando o teste de  $\chi^2$ , observa-se que não há diferença estatisticamente significativa da incidência de neoplasias invasoras de esôfago entre os animais que receberam 100  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 300 ppm de pioglitazone ( $p = 0,73$ ).

A tabela 18 mostra a incidência de carcinoma esofágico invasor nos grupos 4-NQO 50, com e sem quimioprevenção com 100 ppm de pioglitazone, em diferentes fases da carcinogênese.

Tabela 18 – Incidência de carcinoma esofágico invasor nos grupos VIII, XII e XIII

Grupos (n)	Carcinoma esofágico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 50 (37)	14 (37,8)	23 (62,1)	0,22
4-nqo 50 $\rightarrow$ ppar 100 (21)	12 (57,1)	9 (42,8)	
4-nqo 50 + ppar 100 $\rightarrow$ ppar 100 (17)	5 (31,2)	12 (68,7)	

Aplicando-se também o teste de  $\chi^2$ , observou-se que na análise entre os grupos não há diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasias invasoras de esôfago entre os animais que receberam 50  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO com os animais que receberam a mesma dose de indução tumoral com 4-NQO seguida de quimioprevenção com 100 ppm de pioglitazone ou os que receberam quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm não somente após a indução tumoral, mas também durante a fase de iniciação ( $p = 0,22$ ).

As alterações anatomopatológicas vistas em esôfago foram graduadas de acordo com a evolução das mesmas no processo de carcinogênese da via

aerodigestiva superior. A tabela 19 mostra esta distribuição, de acordo com os grupos 4-NQO 100, e a tabela 20 mostra esta distribuição de acordo com os grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone, em diferentes concentrações.

Tabela 19 – Distribuição nos grupos 4-NQO 100, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago

Anatomia patológica	4-nqo 100 n (%)	4-nqo 100 → ppar 300 n (%)
CN	1 (5,5)	0 (0,0)
HE e/ou HQ e/ou P	3 (16,6)	2 (11,1)
DBG	1 (5,5)	0 (0,0)
DAG	1 (5,5)	2 (11,1)
CIS	2 (11,1)	5 (27,7)
<b>CV</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>1 (5,5)</b>
<b>CCEIS</b>	<b>4 (22,2)</b>	<b>6 (33,3)</b>
<b>CCEIMP</b>	<b>1 (5,5)</b>	<b>0 (0,0)</b>
<b>CCEIA</b>	<b>3 (16,6)</b>	<b>2 (11,1)</b>

**Legenda:** Característica normal (CN); hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ) e/ou papilomas (P); displasia de baixo grau (DBG); displasia de alto grau (DAG); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS); carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria (CCEIMP); carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia (CCEIA)

Tabela 20 – Distribuição nos grupos 4-NQO 50, com ou sem quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm, das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago

Anatomia patológica	4-nqo 50 n (%)	4-nqo 50 → ppar 100 n (%)	4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100 n (%)
HE e/ou HQ e/ou P	2 (5,4)	0 (0,0)	3 (18,7)
DBG	3 (8,1)	5 (23,8)	2 (12,5)
DAG	6 (16,2)	2 (9,5)	6 (37,5)
CIS	12 (32,4)	2 (9,5)	0 (0,0)
<b>CV</b>	<b>1 (2,7)</b>	<b>1 (4,7)</b>	<b>0 (0,0)</b>
<b>CCEIS</b>	<b>9 (24,3)</b>	<b>5 (23,8)</b>	<b>3 (18,7)</b>
<b>CCEIMP</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>2 (9,5)</b>	<b>1 (6,2)</b>
<b>CCEIA</b>	<b>4 (10,8)</b>	<b>4 (19,0)</b>	<b>1 (6,2)</b>

**Legenda:** Hiperplasia epitelial (HE) e/ou hiperqueratose (HQ) e/ou papilomas (P); displasia de baixo grau (DBG); displasia de alto grau (DAG); carcinoma *in situ* (CIS); carcinoma verrucoso (CV); carcinoma de células escamosas invasor submucoso (CCEIS); carcinoma de células escamosas invasor até a muscular própria (CCEIMP); carcinoma de células escamosas invasor até a adventícia (CCEIA)

Pode-se observar nas tabelas 19 e 20 uma distribuição mais equalitária das lesões invasoras (em negrito) com as não invasoras ao comparar com a mesma tabela feita para a cavidade oral. Isto mostra que a carcinogênese esofágica é mais dificilmente obtida neste modelo do que a oral. As lesões pré-neoplásicas foram computadas apenas quando as francamente invasoras não eram vistas.

### C) Pré-estômago

O grupo 4-NQO 100 → 300 ppm de pioglitazone foi o que maior incidência de neoplasia gástrica apresentou entre os diferentes grupos de todo o estudo – 27,7%.

Apesar da maior porcentagem no grupo 4-NQO 100 → PPAR 300, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasia gástrica na comparação entre os animais pertencentes ao grupo 4-NQO 100 com o que realizou a mesma dose de 4-NQO seguida de quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm ( $p = 0,40$ ) – teste exato de Fisher – tabela 21.

Tabela 21: Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos I e III

Grupos (n)	Carcinoma gástrico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 100 (18)	2 (11,1)	16 (88,8)	0,40
4-nqo 100 → ppar 300 (18)	5 (27,7)	13 (72,2)	

Não houve diferença estatística significativa na incidência de neoplasia gástrica invasora entre o grupo 4-NQO 50 sem quimioprevenção com os grupos que realizaram quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm na promoção tumoral

( $p=1,00$ ) e na iniciação e promoção tumorais ( $p=0,68$ ) – teste exato de Fisher – tabela 22.

Tabela 22: Incidência de carcinoma gástrico invasor nos grupos VIII, XII e XIII

Grupos (n)	Carcinoma gástrico invasor		P
	Presente n (%)	Ausente n (%)	
4-nqo 50 (37)	5 (13,5)	32 (86,4)	0,82
4-nqo 50 → ppar 100 (21)	2 (9,5)	19 (90,4)	
4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100 (17)	3 (18,7)	14 (81,2)	

Apesar da ausência de significância estatística na maior incidência de neoplasia gástrica no grupo 4-NQO 100 → PPAR 300, o modelo de apresentação dos carcinomas gástricos neste grupo e em alguns animais que receberam 100 ppm de pioglitazone foi bastante inusitado. Comprometimento de toda serosa gástrica, como uma *linite plástica* (figuras 59 e 65), foi vista, em sua grande maioria, nos animais que recebiam 4-NQO e pioglitazone. Quando presentes, eram percebidas à palpação do abdômen, como volumosas massas. Interessante ressaltar que estes tumores gástricos – todos CCE – apresentavam um padrão de disseminação semelhante ao adenocarcinoma gástrico visto em humanos. Provavelmente, pela invasão de serosa, a disseminação celomática ocorria, gerando implantes tumorais em uma ou mais das seguintes estruturas: cápsula hepática, cápsula renal, mesentério, alças intestinais, baço, diafragma, pâncreas e peritônio dos espaços subfrênicos, goteiras parietocólicas e pelve (figuras 60 e 61). Ascite hemorrágica ou não podia ser encontrada. Esta forma de disseminação foi vista apenas nos grupos que receberam associação de 4-NQO com pioglitazone.

Em alguns animais, a invasão por contiguidade de estruturas como o esôfago e lobo hepático podia ser vista, sendo necessária a remoção em bloco da peça cirúrgica (figura 62). Apenas os animais com volumosos tumores esofágicos e, principalmente, os gástricos, podiam apresentar metástases a distância de carcinoma de células escamosas para fígado (figuras 63 e 66) e/ou pulmões (figura 64). Fato este não encontrado em animais com lesões invasoras isoladas de cavidade oral e/ou pequenos tumores de esôfago. A grande maioria destas metástases, de extrema agressividade, apenas foi vista acompanhando os grandes tumores gástricos do grupo 4-NQO 100 → PPAR 300 e em menor quantidade no grupo 4-NQO 50 + PPAR 100 → PPAR 100.

Acredita-se que, de alguma forma, este experimento tenha induzido, acidentalmente, um novo modelo de carcinogênese gástrica, através da ativação de PPAR-? pelo pioglitazone em animais submetidos à exposição prévia com 4-NQO 100 µg/ml ou com 4-NQO 50 µg/ml.

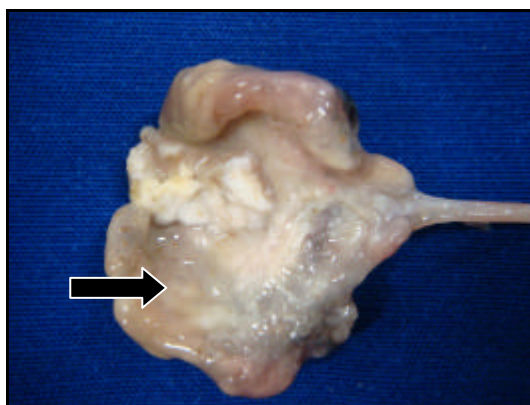


Figura 59 – CCE gástrico tipo *linite plástica* (seta)

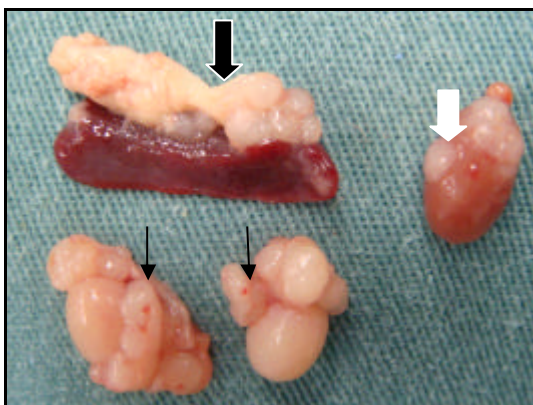


Figura 60 – Implantes de CCE gástrico em cápsulas esplênica (seta larga preta), renal (seta larga branca) e testiculares (setas estreitas)

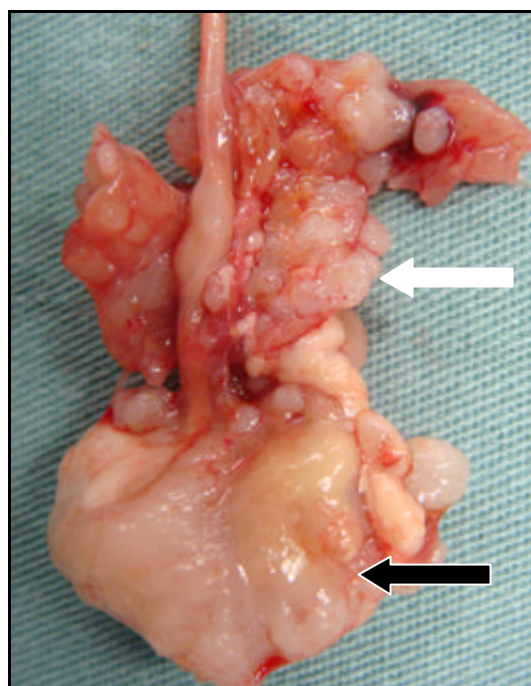


Figura 61 – CCE gástrico com *linite plástica* (seta preta) e disseminação celomática para diafragma (seta branca)

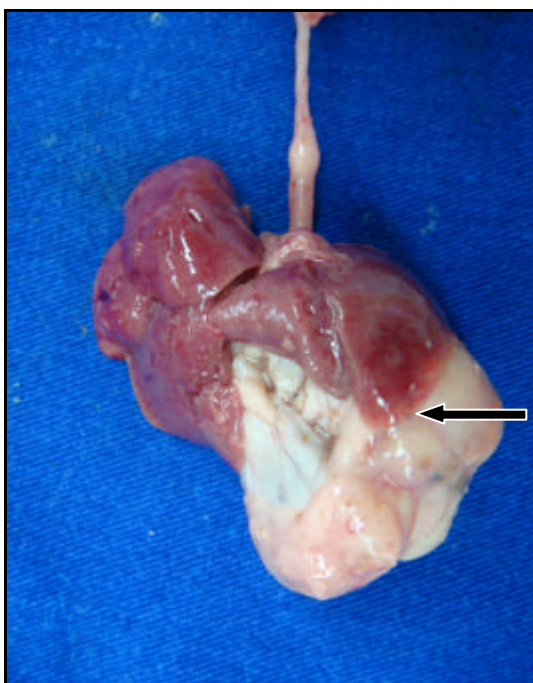


Figura 62 – CCE gástrico com invasão do fígado por contiguidade (seta)

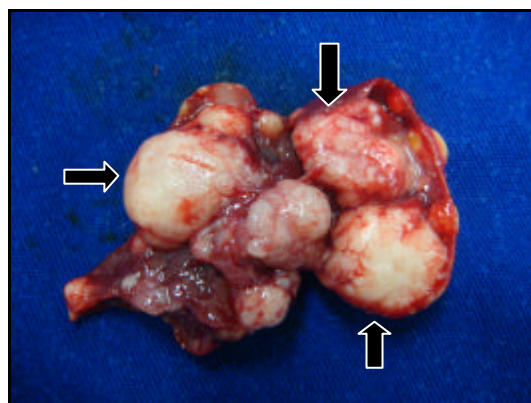


Figura 63 – Metástases em fígado de CCE gástrico (setas)

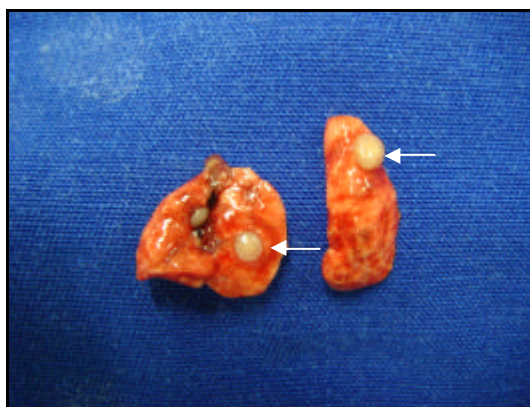


Figura 64 – Metástases pulmonares de CCE gástrico (setas)



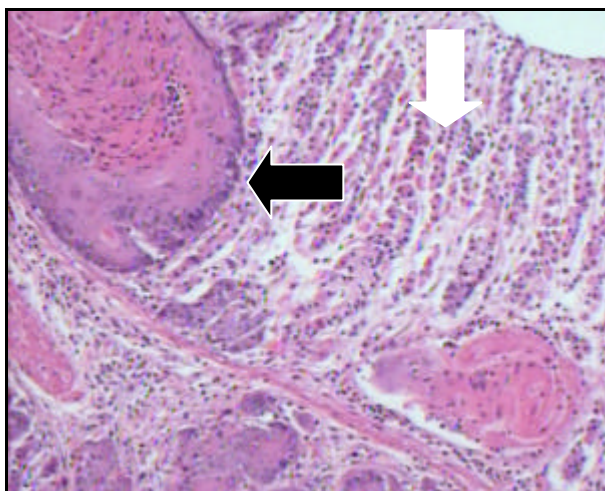


Figura 65: CCE gástrico (seta escura) com invasão da porção glandular do estômago (seta clara) – *linite plástica*, HE 100X

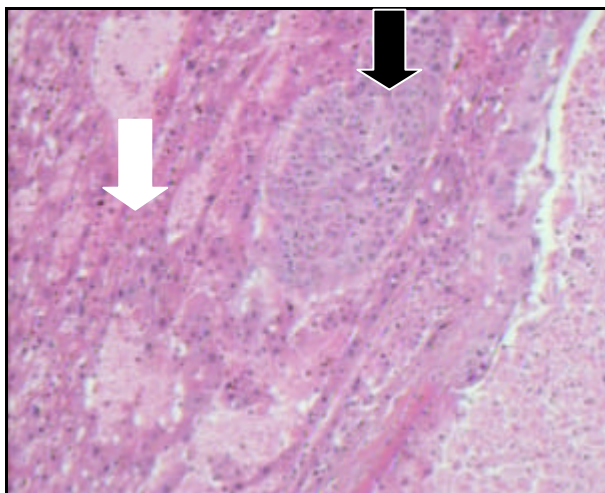


Figura 66: CCE gástrico (seta escura) metastático para fígado (seta clara mostra hepatócitos), HE 100X



#### 4.4.3 Incidência de neoplasias da VADS no grupo 4-NQO 25

Como visto anteriormente, os animais do grupo 4-NQO 25 foram observados, após 8 semanas de indução tumoral, por um total de 48 semanas, já que ao final das 24 semanas, diferentemente dos outros grupos, a maioria dos animais não apresentava lesões tumorais visíveis em cavidade oral (duração total de 56 semanas).

Ao final do período, a incidência de neoplasia oral neste grupo, em específico, foi de 78,2%. Já a incidência de neoplasia esofágica foi de 34,7%. Pode-se observar que a carcinogênese esofágica com a dose mais baixa de 4-NQO é difícil de ser obtida quando comparada à carcinogênese oral, mesmo acompanhando os animais pelo dobro de tempo. Este fato é constatado numericamente: uma dose de 100 µg/ml de 4-NQO levou 55,5% dos animais a desenvolverem neoplasia invasora esofágica em 24 semanas; ao contrário de 25 µg/ml de 4-NQO, que precisou mais que o dobro de tempo para atingir 34,7% de incidência de neoplasia esofágica invasora e, mesmo assim, não conseguiu se equiparar aos 37,8% de incidência das mesmas lesões no grupo 4-NQO 50, já que os animais deste grupo foram acompanhados por apenas 24 semanas.

A incidência de carcinoma gástrico invasor no grupo 4-NQO 25 foi de 0% – o que mostra que maior tempo de seguimento não causa carcinogênese gástrica se não estiver associada com doses mais elevadas de 4-NQO.

No grupo 4-NQO 25, as alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral e esôfago foram graduadas de acordo com a evolução das mesmas no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior. As tabelas 23 e 24 mostram esta distribuição:

Tabela 23 – Distribuição das alterações anatomopatológicas vistas em cavidade oral no grupo 4-NQO 25

Anatomia patológica	Incidências das lesões orais ao final das 48 semanas de observação n (%)
Hiperplasia epitelial e/ou hiperqueratose	3 (13,0)
Displasia discreta a moderada	1 (4,3)
Carcinoma <i>in situ</i>	1 (4,3)
<b>Carcinoma verrucoso</b>	<b>1 (4,3)</b>
<b>CCE invasor</b>	<b>17 (73,9)</b>

\* CCE – carcinoma de células escamosas;

\*\* lesões pré-neoplásicas computadas apenas na ausência das neoplásicas as quais estão em negrito

Tabela 24: Distribuição das alterações anatomopatológicas vistas em esôfago no grupo 4-NQO 25

Anatomia patológica	Incidências das lesões esofágicas ao final das 48 semanas de observação n (%)
Hiperplasia epitelial e/ou hiperqueratose e/ou papilomas	2 (8,6)
Displasia de baixo grau	3 (13,0)
Displasia de alto grau	3 (13,0)
Carcinoma <i>in situ</i>	7 (30,4)
<b>CCE invasor até submucosa</b>	<b>3 (13,0)</b>
<b>CCE invasor até adventícia</b>	<b>5 (21,7)</b>

\* CCE – carcinoma de células escamosas;

\*\* lesões pré-neoplásicas computadas apenas na ausência das neoplásicas as quais estão em negrito

#### 4.5 Análise da mortalidade entre grupos

Durante o período de vinte e quatro semanas que se sucederam ao término da indução tumoral, houve perda de um número considerável de animais em decorrência da evolução natural do processo de carcinogênese e de outras causas, como broncopneumonias e de causas indeterminadas.

A tabela 25 mostra a quantidade de animais em cada grupo que foi a óbito ou eutanasiado por câncer e por outras causas no período de 24 semanas após o término

da indução tumoral com 4-NQO. Nela é também importante observar a ausência de neoplasias nos grupos água e ração, óleo de peixe (OP) 10% exclusivo, PPAR 300 ppm exclusivo e propilenoglicol.

Tabela 25 – Mortalidade geral por grupos nas 24 semanas que sucederam o término do 4-NQO

Grupos (n)	Morte por outras causas		Morte por câncer		Total de óbitos	
	n	%	n	%	n	%
Água e ração (10)	1	10,0	0	0	1	10
4-nqo 100 (18)	0	0	10	55,5	10	55,5
4-nqo 100 → op 10% (20)	2	10	5	25	7	35
4-nqo 100 → ppar 300 (18)	1	5,6	7	38,8	8	44,4
op 10% (5)	0	0	0	0	0	0
ppar 300 (5)	0	0	0	0	0	0
Propilenoglicol (10)	0	0	0	0	0	0
4-nqo 25 (22)	0	0	3	13,6	3	13,6
4-nqo 50 (43)	9	20,9	5	11,6	14	32,5
4-nqo 50 → op 5% (19)	3	15,8	6	31,5	9	47,3
4-nqo 50 + op 5% → op 5% (18)	4	22,2	2	11,1	6	33,3
4-nqo 50 → ppar 100 (21)	1	4,7	4	19	5	23,8
4-nqo 50 + ppar 100 → ppar 100 (19)	4	21	3	15,7	7	36,8

Pode-se observar entre alguns grupos uma taxa de mortes por outras causas superior a 15%. Estes valores pertencem aos animais que fizeram indução de neoplasia com quimioprevenção. Acredita-se que, nestes grupos, a taxa de óbitos por outras causas tenha sido um tanto alta em função da ação conjunta do 4-NQO com óleo de peixe ou com pioglitazone que pode ter levado a graus distintos de toxicidade e, conseqüentemente, dano tecidual e falência orgânica. Isto afasta a interferência de

outros fatores como as condições físicas do biotério ou alimentação, já que o grupo que recebeu apenas água e ração (grupo 0) teve apenas um óbito.

Ao considerar apenas as mortes por câncer nas 24 semanas que se sucederam ao término da indução tumoral, a proporção de óbitos ou eutanásias no grupo que recebeu 100 µg/ml de 4-NQO foi de 55,6%, enquanto que no grupo que recebeu 50 µg/ml de 4-NQO foi de 11,6%. Assim, observa-se que a proporção de mortes por câncer no grupo que recebeu 100 µg/ml foi significativamente maior do que a dos que receberam 50 µg/ml de 4-NQO ( $p < 0,01$ ) no mesmo período. O mesmo pôde ser visto entre os grupos 25 e 100 µg/ml de 4-NQO, quando, em função da taxa de mortalidade por câncer ser de, respectivamente, 13,6% e 55,5%, existir uma diferença significativamente maior de mortes por câncer no grupo de 100 µg/ml de 4-NQO ( $p < 0,01$ ). Já entre os grupos 25 e 50 µg/ml de 4-NQO, a proporção de óbitos por câncer (13,6% vs 11,6%, respectivamente) não foi estatisticamente significativa ( $p = 1,00$ ) – teste exato de Fisher.

Entre os grupos 4-NQO 100 não houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade por câncer:  $p = 0,05$  entre 4-NQO 100 e o grupo com quimioprevenção com óleo de peixe a 10% e  $p = 0,31$  entre 4-NQO 100 e o grupo com quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm (teste de  $\chi^2$ ).

Entre os grupos 4-NQO 50 que receberam ou não óleo de peixe 5% não houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade por câncer:  $p = 0,15$  entre 4-NQO 50 e o grupo com quimioprevenção com óleo de peixe na pós-iniciação;  $p = 1,00$  entre 4-NQO 50 e o grupo com óleo de peixe na iniciação e pós-iniciação e  $p = 0,23$  entre os grupos de quimioprevenção com óleo de peixe na pós-iniciação e com óleo de peixe na iniciação e pós-iniciação – teste exato de Fisher.

Finalmente, entre os grupos 4-NQO 50 que receberam ou não pioglitazone 100 ppm não houve também diferença estatisticamente significativa na mortalidade por câncer:  $p=0,47$  entre 4-NQO 50 e o grupo com quimioprevenção com pioglitazone na pós-iniciação;  $p=0,68$  entre 4-NQO 50 e o grupo com pioglitazone na iniciação e pós-iniciação e  $p=1,00$  entre os grupos de quimioprevenção com pioglitazone na pós-iniciação e com pioglitazone na iniciação e pós-iniciação – teste exato de Fisher.

Para afastar interferências da taxa de óbitos em função de outras causas que não as tumorais nos grupos 4-NQO 100, com e sem diferentes agentes de quimioprevenção, e nos 4-NQO 50, com e sem quimioprevenção com óleo de peixe ou com pioglitazone, foi realizado cálculo estatístico comparativo entre os grupos subdivididos por agente de quimioprevenção utilizado, sendo, também, sem significância estatística os valores encontrados na comparação entre os grupos.

#### 4.6 Análise das curvas de sobrevida entre grupos

Na confecção das curvas de sobrevida, os animais que foram eutanasiados são considerados como óbitos. Isto se deve ao fato de que se mantidos vivos sofreriam desnecessariamente, já que viveriam poucas horas ou dias, o que não interferiria nos resultados finais. Além disso, este trabalho seguiu todos os preceitos de ética em experimentação animal, não permitindo que animal algum agonizasse desnecessariamente.

##### **A) Comparação das curvas de sobrevida entre grupos submetidos a diferentes concentrações de 4-NQO**

Ao comparar o tempo de sobrevida no período de 24 semanas que se sucedeu ao término da indução tumoral entre os grupos que receberam 4-NQO em diferentes concentrações sem quimioprevenção obtém-se a figura 67.

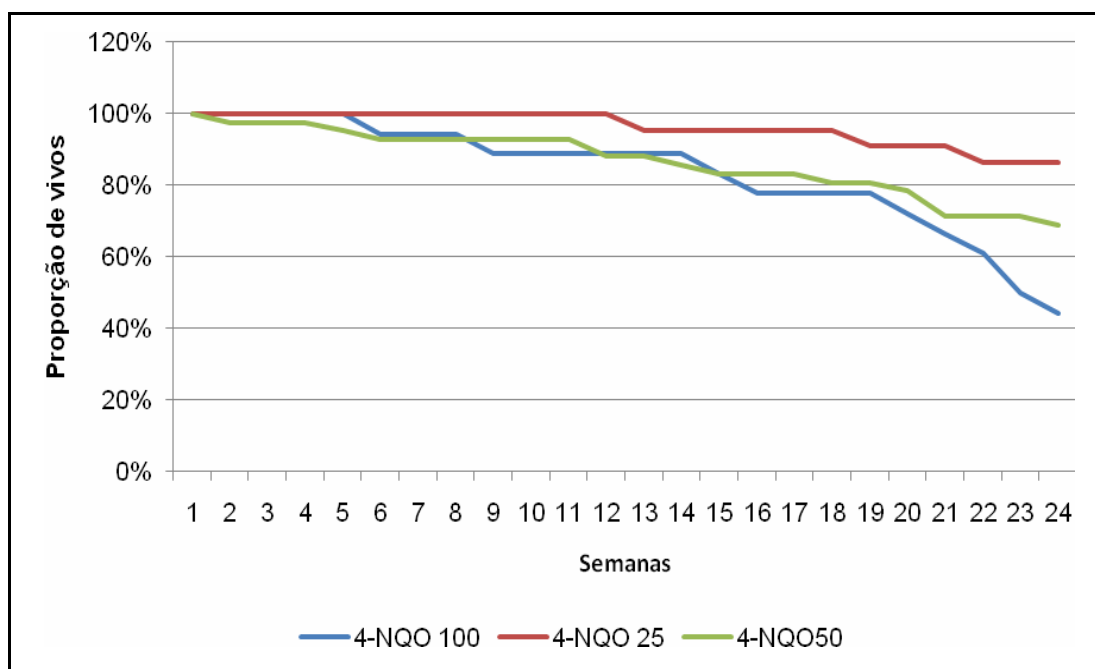


Figura 67 – Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos com diferentes doses de 4-NQO

Ao se aplicar o teste de *logrank*, observa-se que há diferença significativa entre o tempo de sobrevida dos animais que receberam 100 µg/ml e 50 µg/ml de 4-NQO ( $p = 0,01$ ) e entre os animais que receberam 100 µg/ml e 25 µg/ml de 4-NQO ( $p < 0,01$ ). Não existe diferença significativa de sobrevida entre os grupos que receberam 50 µg/ml e 25 µg/ml de 4-NQO ( $p = 0,69$ ).

Ao considerar apenas as mortes por câncer, o tempo de sobrevida ao longo das 24 semanas entre os três grupos apresenta significância estatística (*logrank*,  $p < 0,01$ ), diferindo entre o grupo 4-NQO 100 dos 4-NQO 50 e 4-NQO 25 (figura 68).

Na comparação final entre os grupos, foi visto que 4-NQO 100  $\mu\text{g/ml}$  gerou uma mortalidade superior por câncer (tabela 25) e mais acelerada (figura 68) se comparado com 4-NQO 50  $\mu\text{g/ml}$  e 4-NQO 25  $\mu\text{g/ml}$ .

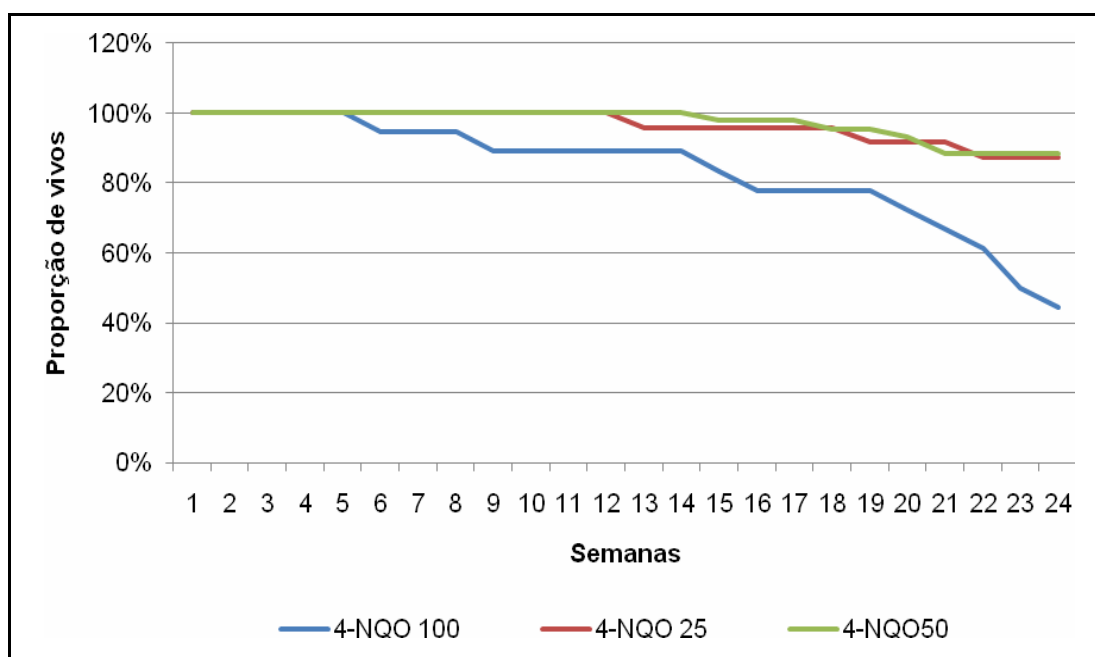


Figura 68 – Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos com diferentes doses de 4-NQO

### B) Comparação das curvas de sobrevida entre os animais submetidos à indução com 100 µg/ml de 4-NQO e posterior quimioprevenção

Ao comparar o tempo de sobrevida entre os animais que receberam a dose máxima de 4-NQO com aqueles que receberam a mesma dose, seguida de quimioprevenção com óleo de peixe ou pioglitazone, no período de 24 semanas após o término da indução tumoral, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos (teste de *logrank*  $p=0,49$ ) – figura 69.



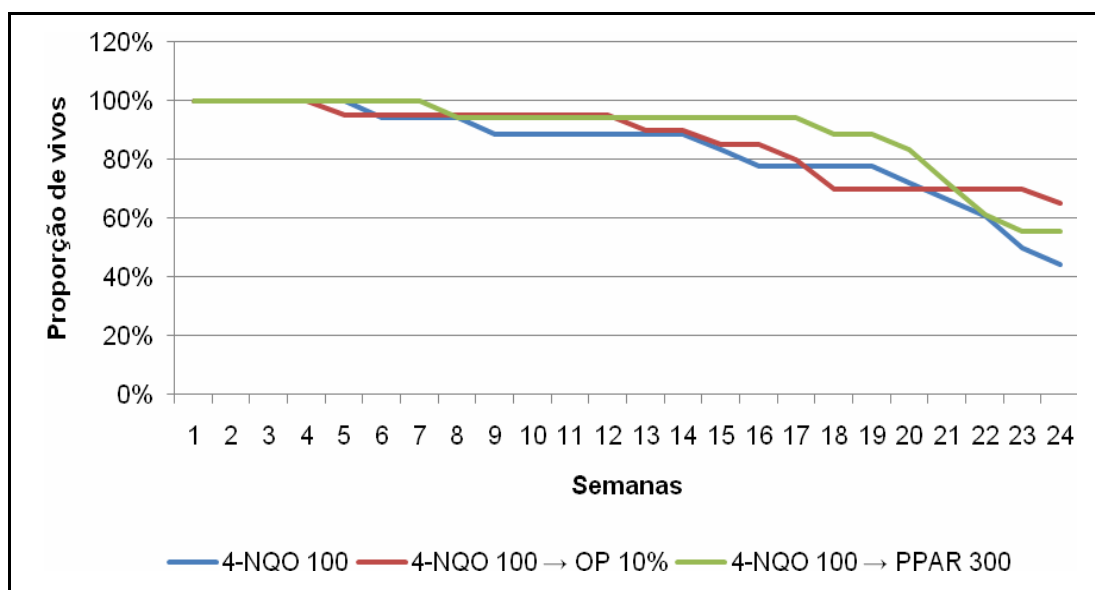


Figura 69 – Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe e pioglitazone

Ao considerar apenas as mortes por câncer, o tempo de sobrevida entre os três grupos permanece sem significância estatística ao longo das 24 semanas (*logrank*,  $p=0,25$ ) – figura 70.

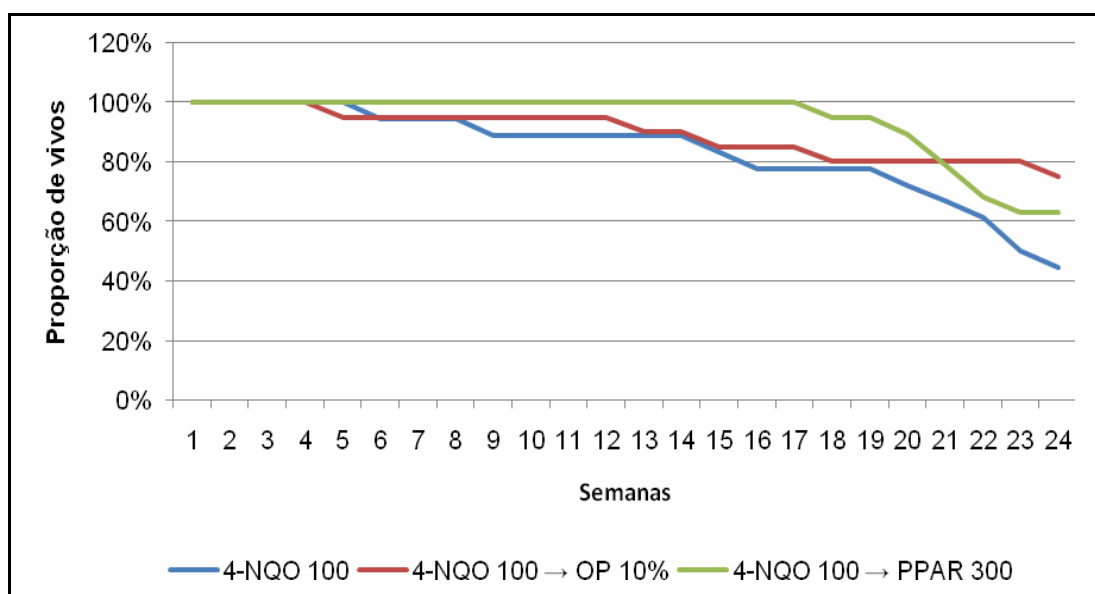


Figura 70 – Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre grupos 4-NQO 100 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe e pioglitazone

### C) Comparação das curvas de sobrevida entre os animais submetidos à indução com 50 µg/ml de 4-NQO e quimioprevenção ou não com óleo de peixe

A análise da sobrevida geral ao longo das 24 semanas que sucederam o período de indução tumoral com 4-NQO 50 µg/ml, seguida ou não de quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese, não mostrou, novamente, diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de *logrank*,  $p = 0,74$ ) – figura 71.

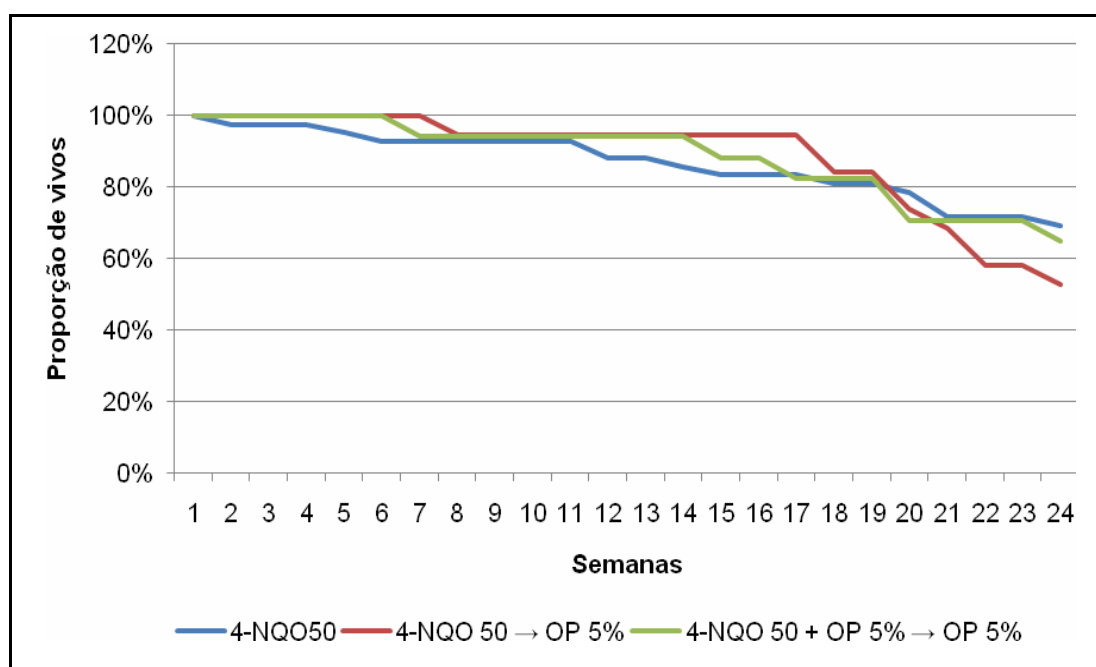


Figura 71 – Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese

Ao considerar apenas as mortes por câncer, o tempo de sobrevida entre os três grupos permanece sem significância estatística ao longo das 24 semanas (*logrank*,  $p=0,23$ ) – figura 72.

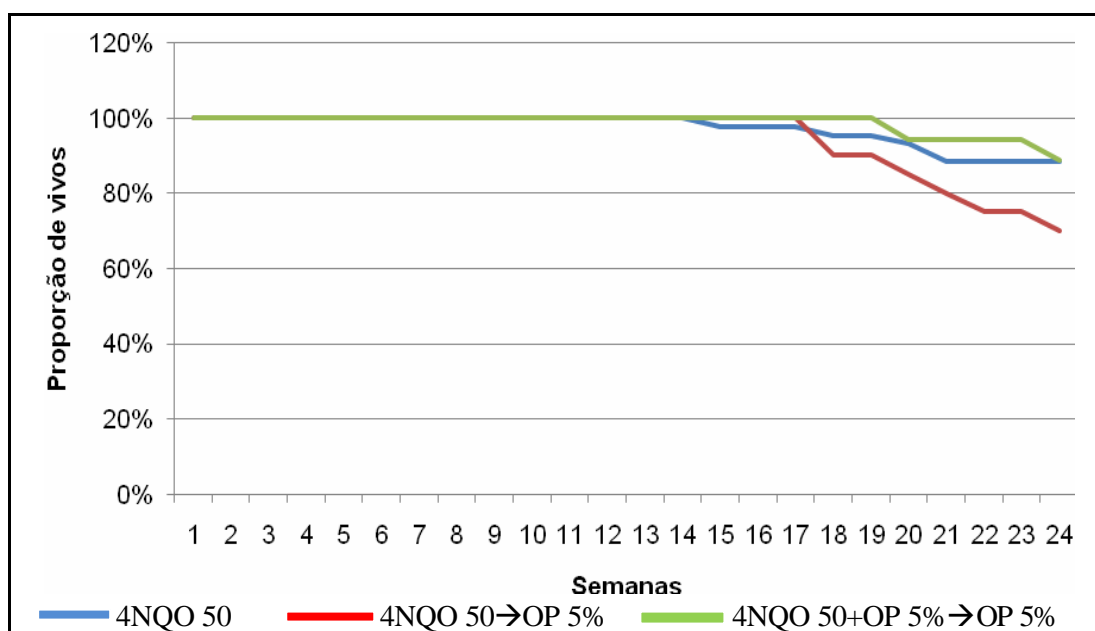


Figura 72 – Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4NQO 50 com e sem quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese

#### D) Comparação das curvas de sobrevida entre os animais submetidos à indução com 50 µg/ml de 4-NQO e quimioprevenção ou não com pioglitazone

A análise da sobrevida geral ao longo das 24 semanas que sucederam o período de indução tumoral com 4-NQO 50 µg/ml, seguida ou não de quimioprevenção com pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese, não mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos (teste de *logrank*,  $p = 0,56$ ) – figura 73.

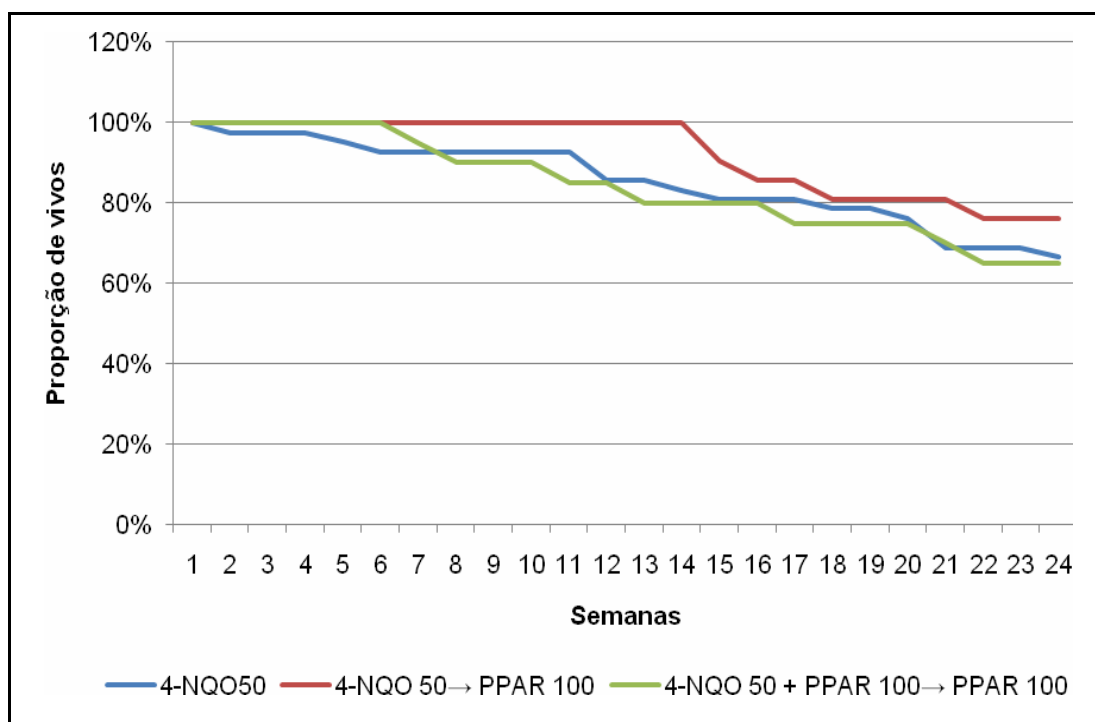


Figura 73 – Sobrevida geral nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese

Ao considerar apenas as mortes por câncer, o tempo de sobrevida entre os três grupos permanece sem significância estatística ao longo das 24 semanas (*logrank*,  $p=0,80$ ) – figura 74.

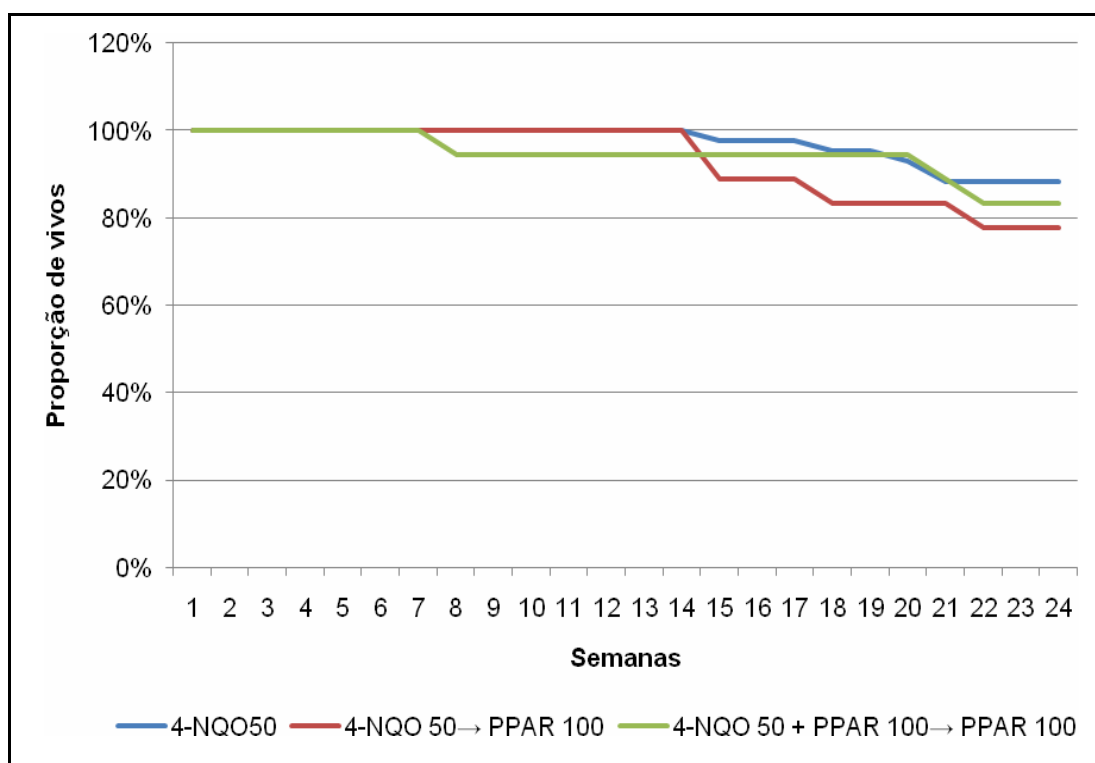


Figura 74 – Sobrevida específica por câncer nas 24 semanas após o término da indução tumoral entre os grupos 4-NQO 50 com e sem quimioprevenção com pioglitazone em diferentes fases da carcinogênese

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Efetividade do modelo de indução tumoral de CCE da via aerodigestiva superior em camundongos Swiss e comparação com outros modelos animais na literatura

Ao analisar todos os animais expostos ao 4-NQO em diferentes concentrações, pertencentes aos grupos controle, excluindo óbitos ou eutanásias precoces, 89,7% dos que pertencem a este estudo desenvolveram neoplasia invasora em pelo menos um órgão da VADS. Os outros 10,2% não desenvolveram em tempo hábil, mas já apresentavam lesões pré-neoplásicas.

O modelo de indução de CCE da VADS, induzido pelo 4-NQO em camundongos, é multifocal e precedido por lesões pré-invasoras<sup>14,30,32,33</sup>. Este mesmo modelo de indução foi obtido com o uso de 4-NQO neste estudo em camundongos Swiss. Como já discutido, o modelo de carcinogênese da VADS provocado pelo 4-NQO se assemelha, em alguns aspectos clínicos e, principalmente, no aspecto molecular, ao visto em humanos causado pelo tabaco. Entretanto, a ausência de metastatização ganglionar, o excessivo número de lesões associadas presentes em cada órgão e a ausência de invasão perineural, vistos na carcinogênese induzida pelo 4-NQO diferem, em muito, do que é rotineiramente visto, na prática clínica, em CCECP de humanos.

Diferentes linhagens de roedores utilizadas com a finalidade de induzir carcinogênese da VADS, com 4-NQO, estão descritas na literatura. Esta carcinogênese foi obtida com sucesso em grande parte dos animais estudados. Em alguns animais houve resistência, o que sugere que a carcinogênese quimicamente induzida também é

um evento multigênico<sup>34</sup>. Camundongos da linhagem **ddN** foram utilizados por Fujino<sup>47</sup>; **CBA** foram estudados por Steidler<sup>30</sup>, Hawkins<sup>21</sup>, Yuan<sup>31</sup>, Tang<sup>33</sup>, Hasina<sup>14</sup>; **MutaMouse** por von Pressentin<sup>52</sup>; **SENCAR** por Kim<sup>173</sup>; **BALB/c** por Gannot<sup>174</sup>; **p53<sup>Val135/WT</sup>** por Zhang<sup>53</sup>; **C57BL/6J** por Fong<sup>175</sup>, Young<sup>176</sup>; **ICR/129Sv** por Gunji<sup>177</sup>, Czerninski<sup>44</sup>; **CB6F1-Tg-rasH2** por Miyamoto<sup>54</sup>, entre outros.

Como já frisado neste estudo, a carcinogênese da VADS quimicamente induzida com o uso de 4NQO diluído na água por oito semanas foi obtida com sucesso em camundongos Swiss. Não há relato encontrado na literatura de indução da carcinogênese de cavidade oral ou esôfago em camundongos Swiss utilizando 4-NQO, mas sim de pré-estômago destes animais, com o uso de outros agentes carcinogênicos como benzapireno<sup>178,179</sup>.

Diferentes doses, duração de exposição ao 4NQO, vias de administração e tempo de observação são relatados na literatura quanto à efetividade de indução tumoral. Estas informações são úteis ao escolher o melhor modelo experimental para investigar os eventos moleculares que contribuem com a progressão do câncer oral e para o teste de novos agentes de quimioprevenção e de estratégias de tratamento<sup>51</sup>.

Tang et al.<sup>33</sup> concluíram que o 4-NQO diluído na água é mais eficaz na indução do câncer que sua aplicação tópica. Quanto maior a dose ou o tempo de aplicação ou o tempo de observação, maior será a incidência de neoplasias invasoras vistas. Estes autores administraram o 4-NQO na água dos animais por oito ou dezesseis semanas em concentrações de 20, 50 e 100 µg/ml, observando os animais, respectivamente, por mais 16 e 8 semanas (duração total do experimento – 22 a 24 semanas). Observaram que 100% dos camundongos CBA e dos C57BL/6 expostos a 100 µg/ml de 4-NQO por 16 semanas desenvolveram carcinoma de células escamosas de língua

e de esôfago. Nos animais expostos à mesma dose por um período de 8 semanas, 100% desenvolveram carcinoma de células escamosas de língua e 75% desenvolveram carcinoma de células escamosas de esôfago. Naqueles expostos a 50 µg/ml de 4-NQO por oito semanas, a mesma taxa de 100% de incidência de neoplasia invasora de língua foi vista após 16 semanas de observação contadas a partir do término da indução tumoral, mas uma taxa menor de neoplasia esofágica foi vista neste grupo – 33%. Nenhuma lesão oral ou esofágica foi vista nos animais que receberam 4-NQO 20 µg/ml por oito semanas, ao final das 24 semanas do experimento.

No presente estudo, utilizou-se 4-NQO diluído na água dos animais, por sabidamente conhecer-se da literatura que o potencial carcinogênico da droga é maior e mais rápido quando administrado desta forma do que através de aplicação tópica. Foram utilizadas doses de 25, 50 e 100 µg/ml de 4-NQO na água por oito semanas. Os animais foram observados por mais 24 semanas, totalizando um período total de duração do experimento, por grupo, de 32 a 34 semanas. Como resultado, foi encontrada uma incidência de neoplasia oral de 77,7% para os expostos a 100 µg/ml e de 72,9% para os expostos a 50 µg/ml. Já a incidência de carcinoma esofágico foi de 55,5% para o grupo 4-NQO 100 e de 37,8% para o grupo 4-NQO 50.

Comparando os dois estudos, pode-se observar que, apesar da incidência de neoplasia esofágica ser um pouco maior neste estudo no grupo 4-NQO 50, as demais incidências de neoplasias, em especial as da cavidade oral, foram menores para esta pesquisa.

Não se sabe explicar ao certo o porquê desta diferença, visto que os animais deste estudo foram observados por mais tempo e é sabido que quanto maior o



período de observação, maior será a incidência de neoplasias invasoras vistas ao final do experimento. Um dos motivos talvez sejam as diferentes cepas de animais utilizadas, já que, como visto anteriormente, os camundongos do estudo de Tang et al.<sup>33</sup> – CBA e os C57BL/6 – com frequência são geneticamente manipulados para expressarem versões modificadas de genes relevantes, o que pode facilitar a ação do 4-NQO na fase de iniciação e, até, acelerar o processo de carcinogênese, em função de um dano genético prévio, ou seja, em função da exposição a um agente carcinogênico em um campo predisposto. Apesar do presente estudo ter trabalhado com camundongos que não são geneticamente modificados, os resultados estatísticos mostraram que este estudo foi pioneiro em obter com sucesso a carcinogênese da VADS em camundongos Swiss com 4-NQO, já que não há estudo anterior testando este agente carcinogênico em camundongos Swiss.

Vale lembrar que muitos animais do presente estudo apresentaram associação de neoplasias invasoras em mais de um órgão. Isto aumentou a incidência de neoplasias por grupo ao se comparar às taxas isoladas de tumor por órgão estudado. Assim, neste estudo, a carcinogênese encontrada em pelo menos um órgão da VADS no grupo 4-NQO 100 chegou a 94,4% e no grupo 4-NQO 50 chegou a 83,7%.

Interessante também comparar que, apesar das baixas taxas de incidência de câncer gástrico deste estudo, elas existiram, em comparação com a ausência de neoplasia gástrica no estudo de Tang et al.<sup>33</sup>. É sabido que a carcinogênese esofágica é mais difícil de ser obtida por ser mais lenta do que a oral neste modelo de indução da carcinogênese. Muitas vezes, necessita de um período de acompanhamento muito superior àquela necessária para o estabelecimento de neoplasia invasora oral. Para o estômago ela é mais lenta ainda. Talvez o que justifique este trabalho ter encontrado

neoplasias de estômago seja o período de observação, que foi oito semanas maior do que o de Tang et al.<sup>33</sup>, o que pode ter possibilitado tempo para que os tumores gástricos invasivos começassem a aparecer.

Outro aspecto interessante no estudo de Tang et al.<sup>33</sup> é a ausência de neoplasias invasoras no grupo que recebeu 20 µg/ml de 4NQO por oito semanas. Pequenas doses de 4NQO demoram mais para induzir a formação de neoplasias invasoras, logo, necessitam de um tempo maior de seguimento para que elas sejam vistas. Em decorrência de terem tido um período de observação curto, não observaram lesões na mucosa da VADS deste grupo. E concluem que se tivessem estudado por mais tempo teriam visto lesões, já que na eutanásia dos animais com dezesseis semanas de seguimento alterações moleculares nos órgãos retirados podiam ser vistas.

Estas conclusões são corroboradas pelo presente estudo, quando no grupo 4NQO 25 foram vistas lesões invasoras na mucosa do trato aerodigestivo superior na mesma proporção, se não maiores, que nos grupos 100 e 50. A incidência de neoplasia oral neste grupo foi de 78,2% e da esofágica de 34,7%. Isto ocorreu, pois os animais deste grupo foram observados por um total de 48 a 50 semanas após o término do 4NQO, o dobro do período de observação dos grupos 50 e 100, que foi de 24 semanas. Cerca de 45,8% chegaram vivos ao final deste longo período. Conclui-se que doses baixas de 4NQO também induzem a formação de neoplasias invasoras, mas necessitam de tempo de observação maior para que elas apareçam.

Como, apesar do longo tempo de seguimento, não foi vista carcinogênese gástrica no grupo 4NQO 25, conclui-se que tumores esofágicos e, principalmente, gástricos não necessitam apenas de tempo maior de observação até que apareçam, mas também de doses maiores do agente carcinogênico, sob pena de nenhuma lesão

invasora ser vista em órgãos baixos da VADS, por mais longo que seja o período de tempo de observação a que os animais sejam submetidos.

Nos camundongos da pesquisa em questão não houve desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico, mesmo porque o modelo de indução da carcinogênese causada pelo 4-NQO, assim como de outros compostos nitrosos citados na literatura, é o de carcinoma de células escamosas, logo, comprometendo a cavidade oral e esôfago. Como os roedores, neste estudo o camundongo, apresentam um “pré-estômago” (*forestomach*), que é de revestimento histológico semelhante ao do esôfago, o mesmo processo de carcinogênese visto em língua e esôfago pôde também ser visto no pré-estômago destes roedores.

Assim, foi possível ver, em parte dos animais deste estudo, lesões pré-neoplásicas e neoplásicas gástricas, nos moldes das carcinogêneses oral e esofágica induzidas pelo 4-NQO.

A literatura é repleta de trabalhos mostrando a indução de carcinoma de células escamosas e lesões pré-neoplásicas em pré-estômago de roedores, desencadeada por carcinógenos diversos, em especial os compostos nitrosos como 1,2-dimetilbenzantraceno<sup>180</sup>, 2-amino-3-metilimidazol-4,5f-quinolina<sup>181</sup>, dietilnitrosamina<sup>182</sup>, benzopireno<sup>179</sup>, *N*-metil-*N*-nitrosurea<sup>183</sup>, metilbenzilnitrosamina e metilamilnitrosamina<sup>184</sup>, além do 4-NQO<sup>185</sup>.

Kossoy et al.<sup>180</sup> estudaram se o modelo de carcinogênese do pré-estômago de camundongos era semelhante ao visto em esôfago, ou seja, iniciando com lesões pré-neoplásicas como hiperqueratoses, displasias e carcinoma *in situ*, evoluindo para carcinoma de células escamosas invasor ou se era como um carcinoma *de novo*, isto é, a formação de um carcinoma no epitélio gástrico sem a presença prévia das lesões

pré-neoplásicas, como costuma ser, em grande parte, o modelo de carcinogênese dos tumores oriundos do epitélio glandular do aparelho digestivo. Concluiu que o modelo de carcinogênese visto no pré-estômago dos camundongos é semelhante ao visto na carcinogênese clássica da via aerodigestiva superior de humanos, ou seja, antecedida de lesões pré-neoplásicas<sup>180</sup>. Este fato também pôde ser constatado nos animais deste estudo pela presença de lesões pré-neoplásicas em alguns epitélios gástricos. Assim, apesar da ausência de epitélio escamoso no estômago humano, o estudo de substâncias com eventual ação quimiopreventiva no pré-estômago de roedores poderá ter ação potencial nas carcinogêneses oral e esofágica de humanos.

Outros trabalhos na literatura mostraram que doses mais baixas de 4NQO aplicadas por mais tempo, apesar de muitos em animais geneticamente modificados, induziram à formação de neoplasias oral, esofágica e até gástrica.

Fong et al.<sup>175</sup> trabalharam com método de aplicação na água na dose de 10 a 20 µg/ml, por um período de 21 semanas, e observando os animais por um total de 21 semanas encontraram carcinoma de células escamosas da cavidade oral, do esôfago e do estômago.

Gunji et al.<sup>177</sup> utilizaram o método de aplicação na água, na dose de 10 µg/ml por 32 semanas. Observaram em um período total de 32 semanas o aparecimento de carcinoma de células escamosas da cavidade oral, esôfago e estômago.

Contraditoriamente ao até aqui exposto, Miyamoto et al.<sup>54</sup>, utilizando camundongo geneticamente modificado para carcinogênese oral, forneceram 20 µg/ml de 4NQO diluídos na água por 8 semanas e os observaram por mais 16 semanas. Ao final do experimento (com 24 semanas), observaram 80% de CCE oral e já encontravam CCE esofágico. Os índices de tumores na VADS destes animais

podem até ser considerados altos ao se analisar a dose de 4-NQO fornecida e o tempo de observação, ambos inferiores às vistas no presente estudo. O grupo 4-NQO 25 da pesquisa em questão apenas apresentou alto índice de neoplasia oral – 78,2% – pois, além de realizar uma dose um pouco superior de 4-NQO, os animais permaneceram em observação por aproximadamente 48 semanas, o que conferiu tempo suficiente para que a carcinogênese se instalasse. Muito provavelmente, se os animais do presente estudo tivessem sido eutanasiados com 24 semanas ou menos de seguimento, como no trabalho de Miyamoto et al.<sup>54</sup>, apenas lesões displásicas poderiam ser vistas e uma porcentagem muito menor, se comparada à vista por estes autores, de CCE oral. Além disso, a incidência na presente pesquisa de CCE esofágico foi muito inferior ao se levar em conta o tempo de observação dos animais: 34,7%. Nenhum animal deste trabalho, no grupo 4NQO 25, desenvolveu câncer gástrico, ao contrário de Miyamoto et al.<sup>54</sup>, que tiveram um caso. Sabe-se que doses maiores de 4-NQO são necessárias para a carcinogênese esofágica e, principalmente, a gástrica. O fato dos autores em questão estarem lidando com animais geneticamente predispostos, indubitavelmente, contribuiu para uma carcinogênese oral, e, principalmente, esofágica e até gástrica tão rápida em animais expostos a dose tão baixa de 4-NQO e acompanhados por tão pouco tempo. Este fato é corroborado na mesma publicação que apresenta animais que não foram geneticamente modificados e que expostos ao mesmo modelo de estudo da carcinogênese que os geneticamente modificados não desenvolveram lesões pré-invasoras ou invasoras na mucosa da VADS até o momento da eutanásia. Assim, fica claro que sem a ajuda das modificações genéticas não é viável a formação de uma

quantidade significativa de tumores na mucosa da VADS, induzidas por doses baixas de 4-NQO, somadas a curto tempo de seguimento.

Czerninski et al.<sup>44</sup> forneceram para camundongos C57BL/6 50 µg/ml de 4 NQO diluídos em água por 16 semanas. Acompanharam os animais por mais 6 semanas, totalizando 22 semanas de experimento, 10 a menos que neste estudo. O objetivo de estudar os animais por menor tempo é não fornecer período hábil para a formação de tumores esofágicos e/ou gástricos, os quais, via de regra, necessitam de um tempo maior de acompanhamento para que sejam vistos; apesar de que no presente estudo a carcinogênese esofágica parece preceder a oral como pôde ser visto no grupo de evolução da carcinogênese composto de 20 animais. Apesar de ser um grupo pequeno, este fato merece ser lembrado. Relatam que, após doze semanas de exposição ao carcinógeno, as primeiras lesões orais já podiam ser vistas. Com 16 semanas, no fim do período de exposição ao 4-NQO, grande parte dos animais apresentava lesões orais visíveis (o que corresponderia à oitava semana de observação do presente estudo) e com 22 semanas completas (que corresponderia à décima quarta semana de observação do presente estudo), encontraram 100% de carcinoma de células escamosas oral. A do presente estudo teve uma incidência de CCE oral, ao final do experimento, de 72,9%. O longo período de exposição à droga no trabalho de Czerninski et al.<sup>44</sup> levou a um aumento na taxa de incidência de tumores de língua e a um aparecimento precoce dos mesmos, quando comparado aos resultados da presente pesquisa para o grupo 4NQO 50. No presente estudo, em função de um período menor de exposição ao 4-NQO 50 – 8 semanas, as primeiras lesões orais invasoras começaram a aparecer com 16 semanas após o término da indução tumoral.

## 5.2 Estudo da evolução da carcinogênese no período entre a ausência de lesões macroscópicas e o início do aparecimento das lesões invasoras

Para estudar a evolução da carcinogênese e quais lesões predominaram nos diferentes períodos de tempo na fase de observação, Hasina et al.<sup>14</sup> utilizaram 50 ou 100 µg/ml de 4-NQO na água dos animais por 8 e 16 semanas. Obtiveram um número inaceitável de óbitos ao administrarem a droga por 16 semanas. Estudaram a evolução da carcinogênese oral no grupo 100 µg/ml tratados por 8 semanas, sacrificando aleatoriamente grupos de 4 a 20 animais nas quarta, oitava, décima segunda, décima sexta, vigésima e vigésima quarta semanas após o término da indução, por um período total de observação de 24 semanas. Concluíram que o modelo da carcinogênese induzida pelo uso de 100 µg/ml de 4-NQO mostrou uma linha de progressão da carcinogênese mais fiel e lógica ao longo do tempo. Ao avaliarem a evolução da carcinogênese após 100 µg/ml de 4-NQO, encontraram: 100% de hiperqueratose na quarta semana; 60% de hiperqueratose e 40% de displasia na oitava semana; 100% de displasia na décima segunda semana; 55% de displasia e 30% de CCE na décima sexta semana; 60% de displasia e 23% de CCE na vigésima semana; 75% de CCE e 25% de displasia na vigésima quarta semana. Concluíram que as hiperqueratoses predominam nas quarta e oitava semanas após o término da indução tumoral com 4-NQO; as displasias predominam nas décima segunda e sexta, além da vigésima semanas e o carcinoma de células escamosas oral predomina próximo da vigésima quarta semana.

No presente estudo, procurou-se realizar a mesma avaliação da carcinogênese, criando-se um grupo composto de 20 animais (grupo IX), que foram distribuídos em quatro caixas de 5, submetidos à indução tumoral por oito semanas com 50 µg/ml de

4-NQO na água. Da primeira à décima quinta semana, após o término da indução tumoral com 4-NQO, um a dois animais eram escolhidos aleatoriamente das caixas e eutanasiados em intervalos de 7 a 14 dias. O objetivo era acompanhar a evolução macroscópica e microscópica das lesões; desde a fase em que não eram visíveis, logo após o término da indução tumoral com 4-NQO, até o momento em que adquiriam aspecto tumoral, ao serem invasoras, por volta das dezesseis semanas após o término da fase de indução tumoral.

Os resultados obtidos nesta amostra de animais, quanto ao estudo da evolução da carcinogênese, em muito diferem do grupo de Hasina et al.<sup>14</sup> apresentado acima, sendo o destes autores mais fiel.

Inicialmente, a pequena amostragem de animais do presente estudo não possibilita uma análise confiável da evolução da carcinogênese induzida pelo 4-NQO. Em um grupo pequeno como este não se chega a uma incidência real de lesões pré-neoplásicas e invasoras por semana estudada, visto que apenas de um a dois animais foram eutanasiados por semana. Estes animais eutanasiados não, obrigatoriamente, conferem uma real evolução da incidência de lesões mais comuns naquela semana em que foram eutanasiados. Os animais foram selecionados para eutanásia aleatoriamente, mas, mesmo assim, o grupo não é fiel quanto à evolução da carcinogênese. O ideal para se avaliar em que fase da carcinogênese determinado grupo se encontra e definir-se com maior propriedade como é a distribuição das lesões e evolução das mesmas ao longo das semanas é realizar a eutanásia de 15 a 20 animais semanalmente, como Hasina et al.<sup>14</sup> fizeram com animais submetidos à exposição com 100 µg/ml de 4-NQO. Desta forma, poderia se estimar quais lesões predominam ao longo das semanas pós-iniciação tumoral.



Em decorrência deste fato, pode-se perceber uma discrepância da evolução das lesões ao longo das semanas (ver tabela 2 dos resultados); notadamente em língua, quando as lesões displásicas discretas a moderadas quase não aparecem e quando são vistas o fazem somente por volta da décima quinta semana, após o carcinoma *in situ*, o qual teve um primeiro caso por volta da quinta semana. Além disso, muitas hiperplasias e hiperqueratoses intercalam-se com carcinoma *in situ*. Sabe-se que esta não é a evolução lógica da carcinogênese, mas isto pode ser explicado, neste estudo, visto à amostra pequena do grupo.

Hasina et al.<sup>14</sup> descrevem uma sequência também pouco lógica da evolução da carcinogênese oral com 50 µg/ml de 4-NQO. Na quarta semana o predomínio é das hiperqueratoses – 75%; na oitava semana do carcinoma de células escamosas (CCE) – 50%; na décima segunda semana das displasias – 75% e apenas 25% de CCE e na vigésima quarta semana obteve-se 75% de CCE. Observou-se que existiram 50% de lesões invasoras por volta da oitava semana, e na décima segunda semana, quando esta incidência deveria ser ainda maior, ela diminuiu para 25%. Acreditamos que Hasina et al.<sup>14</sup> também chegaram a um resultado pouco lógico com este grupo em específico, tendo em vista a pequena quantidade de animais com que trabalharam – 16, com uma média de eutanásias por período de 4 animais. Isto exigiu que o intervalo de eutanásias fosse mais espaçado, principalmente ao final do estudo, quando passaram a ser feitas de quatro em quatro semanas, para doze semanas de intervalo entre os últimos dois grupos de animais; intervalo este demasiado para avaliar a evolução da carcinogênese. Assim, tanto em um estudo como em outro, a exiguidade de animais não possibilitou uma análise mais acurada da evolução da carcinogênese com 4-NQO 50 µg/ml.

Interessante observar que as lesões de esôfago parecem obedecer a uma sequência mais lógica de evolução mesmo no presente estudo com grupo de amostra restrita; com os primeiros casos de displasia de baixo grau aparecendo por volta da terceira semana e predominando até a sexta; com as displasias de alto grau predominando da sexta a nona semanas; os carcinomas *in situ* aparecendo a partir da décima segunda e os primeiros invasores a partir da décima quinta semana (ver tabela 2 dos resultados). Não é possível comparar com os resultados de Hasina et al.<sup>14</sup>, visto que estes estudaram a evolução das lesões orais e não das esofágicas.

Apesar de lógica, a evolução da carcinogênese esofágica do presente estudo, em decorrência da pequena amostra, não deve refletir a verdadeira incidência de lesões microscópicas predominando nas diferentes semanas. Apesar disto, o aparecimento macroscópico das lesões de esôfago parece anteceder às de língua, o que pode ser justificado por uma instalação mais precoce de lesões pré-invasoras em esôfago, visto pelo aparecimento das mesmas na microscopia, antecedendo as lesões microscópicas de língua. Interessante observar que a literatura expõe que a carcinogênese esofágica é mais tardia, sendo necessário maior período de observação para que lesões invasoras sejam vistas. Talvez a instalação de lesões pré-neoplásicas seja mais rápida no esôfago, mas a progressão das mesmas seja mais lenta se comparada à progressão das pré-neoplásicas em cavidade oral.

Mesmo com os problemas relacionados à amostra, este grupo serviu para nos mostrar alguns fatos importantes. Primeiro, nenhum animal desenvolveu qualquer tipo de carcinogênese gástrica, o que sugere que neste órgão ela é mais tardia.

Tang et al.<sup>33</sup> relatam que as primeiras lesões macroscópicas de língua são vistas com oito semanas após o término da indução tumoral. Neste pequeno grupo, é

possível observar que diminutas lesões orais já são vistas por volta da quarta semana (camundongo 6 – figura 46). São lesões extremamente pequenas, por volta de 1 mm a 1,5 mm, que poderiam passar despercebidas em um exame rápido da cavidade oral com o animal acordado ou até anestesiado.

Outro detalhe importante é que a localização da lesão na língua também interfere com o que se vê na literatura. Lesões muito posteriores não são adequadamente vistas com uma simples inspeção da cavidade oral com apenas a exteriorização da língua. Assim, é possível que Tang et al.<sup>33</sup> tenham visto lesões em cavidade oral apenas por volta da oitava semana, por estarem localizadas no terço anterior da língua. Lesões posteriores passariam despercebidas, mesmo sendo nítidas antes da oitava semana. É o que pode ser visto no animal 6 (figura 46), que, apesar da eutanásia na quarta semana, já apresentava diminuta tumoração em região posterior de língua, que poderia passar despercebida com a simples exteriorização da mesma, e somente foi vista em decorrência da remoção completa do órgão. O mesmo foi visto com o camundongo 17 (figura 55), que na décima segunda semana, quando já se esperava uma lesão aparente de língua, nada apresentava com a simples exteriorização do órgão, mas com a remoção completa do mesmo foi possível ver uma lesão pequena posterior.

As pequenas tumorações de língua (entre 1,5 mm e 5 mm) e as bem aparentes ou maiores de 5 mm foram vistas por volta da oitava a nona semanas (camundongo 14, figura 49), como uma lesão na ponta ou no terço anterior do órgão, área de fácil acesso com a simples exteriorização do mesmo (camundongo 13, figura 48). Lesões posteriores, mesmo que bem aparentes, só podiam ser vistas com exame endoscópico adequado, abaixamento da língua, ou até mesmo com a remoção da mesma.

Outro aspecto importante de ser ressaltado é que Tang et al.<sup>33</sup> não tinham acesso ao esôfago e apenas inspecionavam a língua dos animais vivos, acompanhando a evolução tumoral. Como neste estudo procede-se ao sacrifício dos animais, o esôfago também pode ser estudado em toda sua extensão e, ao que tudo indica, a instalação da carcinogênese parece ser mais rápida no esôfago, com o aparecimento das primeiras e diminutas lesões (até 1,5 mm) no mesmo, mas não em língua, por volta da terceira semana. Pequeno tumor esofágico já pôde ser visto na quarta semana (camundongo 7, figura 47), com tamanho variando de 1,5 mm a 5 mm, o que mais uma vez antecedeu o aparecimento de pequenas lesões orais. Tumor volumoso, e até estenosante de esôfago, pôde ser visto por volta da décima segunda semana (camundongo 17, figura 50) e até os múltiplos, por volta da décima quarta semana (camundongo 18, figura 51), todas lesões pré-neoplásicas.

Por último, Tang et al.<sup>33</sup> relatam que boa parte dos animais apresentava lesões invasoras com dezesseis semanas após o período de indução tumoral. Concordando com a literatura, os dois animais restantes do grupo, que foram eutanasiados por volta da décima quinta semana, apresentavam lesões invasoras em esôfago (camundongo 19, figura 53 e camundongo 20, figura 54) e em língua (camundongo 20, figura 52).

### 5.3 Análise da mortalidade entre os grupos controle e da incidência de neoplasias da VADS nos modelos de indução com 25, 50 e 100 µg/ml de 4-NQO

Durante o período de observação nos grupos controle é esperada uma certa taxa de óbitos em função da progressão da carcinogênese. Além dos óbitos por câncer, é

esperada uma taxa de óbitos em decorrência de outros fatores, como os ligados a outras doenças, fatores genéticos e à ação do 4-NQO, que pode causar dano ou falência orgânica.

Ao se analisar a mortalidade em decorrência de outras causas, apenas nos grupos controle de 4-NQO – 100, 50 e 25 µg/ml, ela foi de 10,8%; já a mortalidade específica por câncer foi de 21,6%. Ao considerar apenas as mortes por câncer nas 24 semanas que se sucederam ao término da indução tumoral, a proporção de óbitos ou eutanásias no grupo que recebeu 100 µg/ml de 4-NQO foi de 55,6%; no grupo que recebeu 50 µg/ml de 4-NQO foi de 11,6% e no grupo 4-NQO 25 foi de 13,6%. Assim, observa-se que a proporção de mortes por câncer no grupo que recebeu 100 µg/ml foi significativamente maior tanto nos que receberam 50 µg/ml de 4-NQO ( $p < 0,01$ ) como naqueles submetidos à exposição com 25 µg/ml de 4-NQO ( $p < 0,01$ ). Como já visto nos resultados, 100 µg/ml de 4-NQO gerou uma mortalidade maior, por esta ter sido mais acelerada.

Tang et al.<sup>33</sup> relatam uma taxa de mortalidade de 20% para camundongos CBA e de 30% para camundongos C57BL/6 após 16 semanas de indução tumoral com 4-NQO 100 µg/ml na água. Após este período, os animais foram observados por mais 12 semanas, finalizando um total de 28 semanas de experimento.

Os resultados do presente estudo mostram uma taxa de mortalidade maior ao se analisar individualmente os grupos. No grupo 4-NQO 100, a taxa de mortalidade por câncer em camundongos Swiss foi de 55,5%, muito superior à vista por Tang et al.<sup>33</sup>, visto que se esperava uma taxa de mortalidade inferior no presente estudo. Isto se deve ao fato de apesar da mesma dose de 4-NQO em ambos os estudos, o período de exposição ao mesmo na pesquisa em questão foi de apenas 8 semanas, comparado às

16 semanas de Tang et al.<sup>33</sup>. Sabe-se que quanto maior o período de exposição à droga, maior e mais rápida é a incidência de neoplasias, o que pode aumentar a mortalidade de um dado grupo. Em contrapartida, este estudo observou os animais 4 semanas a mais, o que pode ter possibilitado a evolução de tumores invasivos, já formados, que levaram os animais a óbito após as 20 semanas de observação, quando a taxa de mortalidade por câncer aumentou consideravelmente. Isto quer dizer que se a eutanásia dos animais tivesse sido realizada após o mesmo período de observação de Tang et al.<sup>33</sup>, a taxa de mortalidade deste estudo estaria equiparada à de Tang et al.<sup>33</sup> – 22,2%, pois quanto maior o período de observação, maior será a probabilidade de morte, em função da evolução natural da carcinogênese. Observa-se que apesar de similar à de Tang et al.<sup>33</sup>, a taxa de óbito permanece maior para o presente estudo ao se levar em conta a proporção de óbitos com o tempo de exposição ao 4-NQO em ambos os estudos.

No mesmo trabalho, Tang et al.<sup>33</sup> relatam uma taxa de mortalidade de 20% para camundongos CBA expostos a 100 µg/ml de 4-NQO por oito semanas, acompanhados por mais 16 semanas, após o término da indução tumoral. No presente estudo, o tempo de observação foi 8 semanas maior, o que pode ter possibilitado uma taxa de óbitos por câncer também maior – 55,5%. Caso os animais tivessem sido observados pelo mesmo período de Tang et al.<sup>33</sup>, a taxa de mortalidade seria de 16,6%, ou seja, menor que a destes autores. O que provavelmente justifique uma maior taxa de mortalidade no grupo de Tang et al.<sup>33</sup> é a maior incidência de neoplasia induzida pelos mesmos – 100% em cavidade oral e 75% em esôfago. No presente estudo, a incidência de neoplasia invasora oral, apesar do período maior de observação, foi de 77,7% e esofágica de 55,5%.

Ainda no mesmo trabalho, Tang et al.<sup>33</sup> também utilizaram camundongos CBA submetidos à exposição de 4-NQO na dose de 50 µg/ml diluído na água por oito semanas, semelhante a este estudo, ao se analisar o grupo 4-NQO 50. O período de seguimento dos animais após o término da indução tumoral foi de 16 semanas; 8 semanas a menos que neste trabalho. Assim, era esperada uma taxa de mortalidade por câncer menor para o estudo de Tang et al.<sup>33</sup>. Esta taxa foi de 40% para camundongos CBA. A do presente estudo foi de apenas 11,6%. O que justifica uma menor taxa de morte por câncer no estudo em questão talvez seja o menor potencial carcinogênico que o 4-NQO teve na cavidade oral dos camundongos Swiss. Tang et al.<sup>33</sup> relatam uma taxa de incidência de neoplasia oral de 100% e esofágica de 33%; em contrapartida, neste estudo, apesar do maior período de observação, a incidência de neoplasia oral para o grupo 4-NQO 50 foi menor – 72,9% e esofágica foi um pouco maior – 37,8%.

Acredita-se que por um menor tempo de seguimento que o desta pesquisa, Tang et al.<sup>33</sup> não viram carcinogênese gástrica nos animais induzidos com 100 ou com 50 µg/ml de 4-NQO. Diferentemente, os resultados do presente estudo mostram uma incidência de câncer gástrico de 11,1% no grupo 4-NQO 100 e de 13,5% no grupo 4-NQO 50, muito provavelmente por se ter acompanhado os animais 8 semanas a mais do que Tang et al.<sup>33</sup>.

Hasina et al.<sup>14</sup>, ao fornecerem 50 e 100 µg/ml de 4-NQO na água de camundongos CBA por 8 e 16 semanas, observaram uma mortalidade inaceitável quando tanto 50 como 100 µg/ml eram fornecidos aos animais por 16 semanas. Nos animais que fizeram uso de 100 µg/ml ou de 50 µg/ml por 8 semanas, o período de observação foi de 24 semanas, delineamento igual ao deste trabalho. Nos animais do

grupo 50 µg/ml, ao final do experimento, 75% apresentavam carcinoma de células escamosas oral, resultado este semelhante ao do grupo 4-NQO 50 do presente trabalho, que apresentaram uma incidência de 72,9% de CEC oral. Já nos animais do grupo 100 µg/ml, ao final do experimento, 75% apresentavam carcinoma de células escamosas oral, resultado este novamente semelhante ao da presente pesquisa, que foi de 77,7%. Um dado interessante do trabalho de Hasina et al.<sup>14</sup> chama a atenção: nenhum óbito em decorrência de câncer em ambos os grupos durante o período do experimento, fato este que não pôde ser reproduzido neste trabalho, que apresentou 55,5% de mortes por câncer no grupo 4-NQO 100 e 11,6% de mortes por câncer no grupo 4-NQO 50, durante o período de observação de 24 semanas. Foi em decorrência deste valor inaceitável de mortes por câncer no grupo 4-NQO 100 que os demais grupos submetidos à indução tumoral para posterior quimioprevenção o foram com 4-NQO 50.

#### 5.4 Critérios utilizados para averiguar a incidência das diferentes lesões pré-invasoras e invasoras na mucosa da VADS

Conforme visto no item 3.8 do item Métodos, as tabelas de incidência de neoplasias vistas nos resultados computam apenas a ausência ou presença das lesões invasoras e não das pré-invasoras e isto se deveu a alguns fatos.

Primeiro, ao considerar a presença ou ausência das lesões invasoras, pode-se afirmar, com certeza, se determinada droga apresentou ou não efetividade quimiopreventiva; diferentemente de se analisar as lesões pré-invasoras, quando a presença de displasia ou de carcinoma *in situ* não necessariamente traduz



quimioprevenção pouco efetiva ou ineficaz, visto que uma das funções da quimioprevenção é interromper o processo de carcinogênese na fase pré-neoplásica. Logo, ao considerar este fato, o agente quimiopreventivo pode ter sido eficaz apenas por ter retardado ou interrompido o processo de carcinogênese nas lesões pré-invasoras (atuação na progressão tumoral). Assim, a presença de uma lesão *in situ*, mas não de uma invasora, poderia ser considerada como em decorrência de quimioprevenção eficaz. Alvo de crítica desta decisão é o fato de que uma lesão é *in situ* por não ter tido tempo hábil para invasão e não por efetividade da quimioprevenção em si.

Acredita-se que se a incidência de neoplasias invasoras na comparação entre os grupos for a mesma, pode-se afirmar com maior propriedade que uma determinada lesão foi diagnosticada na fase *in situ* não por, obrigatoriamente, efetividade da quimioprevenção, mas, provavelmente, por falta de tempo hábil de evolução tumoral ou, até mesmo, com menor probabilidade, ineficácia da indução tumoral em algumas outras lesões, como as hiperqueratoses e displasias discretas, em levá-las à invasão franca.

Ao se analisar os resultados deste trabalho, percebe-se que o número de lesões invasoras foi considerável em ambos os grupos (com ou sem quimioprevenção). Assim, estudar as lesões pré-invasoras pareceu desnecessário. Caso a incidência de lesões invasoras fosse estatisticamente significativa entre os grupos, estudar as lesões pré-invasoras seria crucial, para saber se a quimioprevenção foi eficaz apenas no processo de progressão tumoral ou também nos de iniciação e promoção.

Segundo, como o modelo de carcinogênese induzido pelo uso de 4NQO é através da evolução de lesões pré-neoplásicas em neoplásicas, como o visto na via

aerodigestiva superior de humanos induzida pelo tabaco, todos os animais que apresentavam lesões invasoras, subentendia-se que já haviam tido toda evolução anterior da carcinogênese, ou seja, apesar da ausência de lesões pré-invasoras no mesmo órgão de alguns animais, não haveria como excluir estes casos do grupo de lesões pré-invasoras, já que a lesão invasora já foi hiperqueratose, displasia e carcinoma *in situ*.

Outra questão importante é que a imensa maioria das lâminas com lesões invasoras de língua e/ou de esôfago tinha concomitantemente uma multiplicidade de outras lesões, a maioria displasias e carcinoma *in situ*, dispersas na cavidade oral, esôfago e até pré-estômago dos animais. Mesmo amostrando com cuidado as várias lesões multifocais macroscópicas, uma ou outra poderia não ser seccionada e estudada devidamente, em função do tamanho, corte, número de lesões, entre outros fatores.

Assim, não foi considerada a incidência de displasias e carcinoma *in situ* entre os diversos grupos, visto a incidência de lesões invasoras sem diferença estatisticamente significativa entre os que receberam ou não quimioprevenção (vide resultados), cuja presença por si inviabiliza o uso de determinada droga que era candidata à função quimiopreventiva em câncer.

Para avaliar com maior confiabilidade a efetividade da indução tumoral com 4-NQO, no tocante ao desenvolvimento de neoplasias invasoras, deve-se levar em conta que o período em que o animal foi a óbito ou sacrificado interferiria nesta avaliação final. Exemplificando: um animal que foi eutanasiado na quarta semana após o término da indução tumoral, por motivos de agonia respiratória de etiologia infecciosa pulmonar, e que não tivesse sinais anatomopatológicos de lesões invasoras

em VADS não era considerado no grupo de indução ineficaz de neoplasia pelo 4-NQO, visto que, pela eutanásia precoce, não houve tempo hábil para que a carcinogênese se instalasse ou desenvolvesse. Assim, na análise de incidência de neoplasias invasoras, os óbitos ou eutanásias precoces (anterior a 16 semanas no grupo 4-NQO 100 e anterior a 20 semanas no grupo 4-NQO 50) daqueles animais que ocorreram antes do período considerado mínimo para que neoplasias invasoras pudessem ser vistas, foram desconsiderados. Este período foi estabelecido com base na literatura<sup>33</sup> e na observação de que nos animais deste estudo a grande maioria apresentava lesões invasoras após 16 semanas e 20 semanas, com doses de 100 e 50 µg/ml de 4-NQO, respectivamente.

Em decorrência do exposto, existe uma possibilidade menor de subestimar a indução tumoral em decorrência de óbitos precoces de causas outras que não a tumoral, por poder não ter havido tempo hábil de desenvolver lesões invasoras nos grupos sem quimioprevenção. Também, nos grupos com quimioprevenção, exclui-se a possibilidade de superestimar a mesma, por minimizar a possibilidade dos animais não terem câncer por eficácia da quimioprevenção quando não os têm por terem ido a óbito ou terem sido sacrificados precocemente, antes que a carcinogênese chegasse na fase invasora.

### 5.5 Análise da mortalidade entre grupos submetidos à quimioprevenção com óleo de peixe e impacto da ação do mesmo na incidência de neoplasias da VADS

Durante o período de observação nos grupos controle e de quimioprevenção nos grupos em vigência da mesma, é esperada uma certa taxa de óbitos em função da

progressão da carcinogênese. Além dos óbitos por câncer, é esperada uma taxa de óbitos em decorrência de outros fatores, como os ligados a outras doenças, fatores genéticos, à ação do 4-NQO e à ação isolada ou em conjunto do óleo de peixe com o 4-NQO, que podem causar dano ou falência orgânica. No grupo 4-NQO 100 → OP 10%, a morte por outras causas que não as tumorais foi de 10%. Na comparação com o grupo controle, que foi de 0%, não houve diferença estatística significativa. Também foi similar a morte por outras causas que não as tumorais na comparação entre os grupos 4-NQO 50 → OP 5% (15,8%) e 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5% (22,2%), na comparação com o grupo 4-NQO 50 (20,9%).

Neste estudo, ao se analisar as taxas de mortalidade por câncer em 24 semanas para o grupo que foi exposto a ação de 4-NQO 100 seguido de quimioprevenção com PUFAS ômega-3 10% e comparar com o grupo controle, observa-se uma diferença numérica, porém não estatística. No grupo sem quimioprevenção esta taxa chegou a 55,5% e no grupo com quimioprevenção ela foi de 25%, apenas metade da anterior, mas sem significância estatística. Esta diferença numérica não parece mostrar um efeito protetor de PUFAS ômega-3, visto que, ao final do período com a eutanásia de todos os animais, a taxa de neoplasia oral no grupo controle foi de 77,7% e no grupo com quimioprevenção foi numericamente superior – de 80%. Já a taxa de neoplasia esofágica foi de 55,5% para o grupo controle e de 50% para o grupo com quimioprevenção, mostrando que o emprego de 10% de PUFAS ômega-3 na dieta não trouxe nenhum benefício quimiopreventivo.

Inicialmente, a alta taxa de mortalidade encontrada no grupo 4-NQO 100 era justificada pela formação de uma maior quantidade de tumores de evolução rápida, portanto mais agressivos, que não possibilitavam tempo para uma eventual ação

antitumoral de PUFAS ômega-3. Em decorrência deste fato, optou-se por reduzir a dose do 4-NQO para 50 e, com isso, foi criado mais um grupo controle e um grupo que após a indução fez quimioprevenção com PUFAS ômega-3 a 5%. Optou-se, também, por reduzir a dose de PUFAS ômega-3, visto que alguns animais que fizeram uso da concentração 10% experimentaram reações cutâneas severas, com formação de placas e crostas, descamação e queda de pelos, o que necessitou o afastamento destes animais no começo do estudo.

Ao reduzir as doses de 4-NQO e óleo de peixe, resultados interessantes foram encontrados. Ao se analisar a taxa de mortalidade para o grupo 4-NQO 50, é visto que ela é de 11,6% e para o grupo que realizou quimioprevenção com óleo de peixe na pós-iniciação ela é até maior – 31,5%. Ao procurar uma causa para esta diferença numérica, deparou-se com uma diferença estatisticamente significativa na incidência de determinados tumores entre estes dois grupos. Ao final do período, com a eutanásia de todos os animais, a taxa de neoplasia oral no grupo controle foi de 72,9% e no grupo com quimioprevenção na pós-iniciação foi numericamente superior – de 84,2%. Já a taxa de neoplasia esofágica foi de 37,8% para o grupo controle e de 68,4% para o grupo com quimioprevenção na pós-iniciação, valor este considerado significativo do ponto de vista estatístico.

Uma terceira tentativa de encontrar um efeito benéfico de PUFAS ômega-3 neste modelo de carcinogênese da VADS já estava em andamento. Boa parte dos trabalhos estuda um potencial agente quimiopreventivo na fase de iniciação ou na fase de promoção tumorais. Poucos estudaram a quimioprevenção sequencial nas fases de iniciação e promoção tumorais. Neste trabalho, optou-se por estudar, em

outro grupo, a quimioprevenção sequencial, já que o 4-NQO é um agente carcinogênico completo, ou seja, iniciador, promotor e progressor tumoral.

Assim, foi criado o grupo 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5%. Esta associação também não mostrou nenhum benefício em conter a carcinogênese. A taxa de óbitos por câncer no período de 24 semanas foi de 11,1%, similar a do grupo controle. A incidência de neoplasia oral foi de 64,7% (*vs* 72,9% do grupo controle) e a esofágica de 29,4% (*vs* 37,8% do grupo controle), as quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Ao comparar as incidências de neoplasias no grupo com óleo de peixe na iniciação e promoção tumorais com o grupo que realizou PUFAS ômega-3 apenas na fase de promoção tumoral, os valores para neoplasia oral também não são significativos do ponto de vista estatístico (64,7% para PUFAS ômega-3 também na fase de iniciação *vs* 84,2% para PUFAS ômega-3 apenas na fase de promoção), mas o são para neoplasia de esôfago (29,4% para PUFAS ômega-3 também na fase de iniciação *vs* 68,4% para PUFAS ômega-3 apenas na fase de promoção).

Ao se observar os resultados de cavidade oral, observam-se as maiores incidências numéricas, mas não estatísticas, de neoplasia oral no grupo 4-NQO 100 → OP 10 %, do que no grupo 4-NQO 100. A mesma discussão pode ser feita na comparação entre as maiores incidências de câncer oral no grupo 4-NQO 50 → OP 5%, em comparação com os grupos 4-NQO 50 e 4-NQO 50 + OP 5 % → OP 5 %.

É sabido que a cavidade oral é mais suscetível à formação de neoplasias invasoras do que outros órgãos da VADS no modelo de carcinogênese desencadeado pelo 4-NQO. É também sabido da literatura que doses baixas de 4-NQO são menos indutoras de neoplasia esofágica, o que justifica as taxas encontradas nos grupos 4-

NQO 50 e 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5% quando comparadas às taxas de neoplasia oral nos mesmos grupos. Mesmo assim, a taxa de incidência de neoplasia esofágica invasora no grupo 4-NQO 50 → OP 5% aproximou-se da taxa de neoplasia invasora oral do grupo 4-NQO 50 e ultrapassou a taxa de neoplasia invasora oral do grupo 4-NQO 50 + OP 5% → OP 5%.

Assim, nos grupos 4-NQO 50, tanto as incidências de neoplasia oral como a da esofágica invasoras foram maiores para o grupo 4-NQO 50 → OP 5%. Em esôfago, este fato é corroborado pela diferença estatística significativa na comparação com o controle. Na literatura é descrita ação antitumoral de determinado agente em um órgão ou tecido e eventual ação pró-tumoral do mesmo agente em outro órgão ou tecido, como o observado por Mayne et al.<sup>71</sup> com o beta-caroteno, o qual mostrou-se promissor na quimioprevenção de CCECP, mas com potencial efeito pró-tumoral em trato respiratório e pulmões de pacientes tabagistas. Os autores do presente estudo acreditam que o emprego do óleo de peixe apenas na pós-iniciação possa ter, de alguma forma, potencializado a carcinogênese esofágica iniciada pela ação do 4-NQO. Outras opiniões podem advogar que todos os efeitos tumorais vistos nos grupos óleo de peixe podem ser uma simples evolução do processo de carcinogênese desencadeado pelo 4-NQO.

Sabe-se que o acréscimo de PUFAS ômega-3 na dieta provoca mecanismos pró-diferenciação, antiproliferação e pró-apoptóticos em vários tipos de câncer estudados<sup>93</sup>. Entretanto, estudos epidemiológicos que tentam correlacionar o consumo de PUFAS ômega-3 e o risco de desenvolvimento de câncer em humanos são inconclusivos<sup>186</sup>. Cerca da metade dos estudos que tentou correlacionar o aumento da ingesta de PUFAS ômega-3 com menor risco de desenvolvimento de

câncer falharam em mostrar esta associação<sup>93</sup>. Uma das explicações possíveis para este achado negativo é que a população que fez uso de PUFAS ômega-3 o fez em doses muito baixas para gerar qualquer efeito protetor<sup>93</sup>; diferentemente dos estudos feitos em animais, quando as doses muito elevadas levaram a resultados positivos.

Não existe um consenso de dose antitumoral de PUFAS ômega-3. Os trabalhos versam o acréscimo de 10, 20 ou até 30% de óleo de peixe na dieta dos animais, com resultados positivos no controle da caquexia, no estímulo do sistema imune e até na inibição do crescimento tumoral em algumas linhagens celulares neoplásicas<sup>187</sup>. Estas doses são, se aplicadas em humanos, muito maiores do que as convencionalmente utilizadas para efeito hipolipemiante. A exequibilidade em seres humanos necessitaria ser testada.

Outra explicação seria a ausência de valor estimado de consumo de PUFAS ômega-3 na população estudada<sup>93</sup>. Um aspecto que necessita ser levado em conta nas populações estudadas é que a maior parte dos estudos examinou a associação entre o risco de câncer e o total de peixe ingerido e não a quantidade de gordura de peixe ingerida<sup>93</sup>. A composição da gordura depende da área geográfica em que o peixe vive. A dieta do animal, variações climáticas, temperatura da água, salinidade e profundidade em que o peixe vive também são importantes, sendo a maior concentração de PUFAS ômega-3 em peixes de águas frias<sup>81</sup>.

Outra questão também não levada em consideração é a de que conhecendo como funciona a síntese de eicosanoides, parece ser muito mais importante a relação de ingesta PUFAS ômega-3 e PUFAS ômega-6 do que a quantidade absoluta de ingesta de PUFAS ômega-3<sup>93</sup>, visto que PUFAS ômega-6 apresentam efeitos pró-tumorais. É sabido que PUFAS ômega-3 apresentam efeito protetor para o sistema



cardiovascular e que uma mudança nos padrões nutricionais da população ocidental, adicionando alimentos ricos em ômega-3 à dieta, poderia reduzir em cerca de 70% a mortalidade por doenças cardiovasculares<sup>188</sup>. Esta mesma população consome uma dieta cuja relação ômega-3/ômega-6 ou n3:n6 é de 1:10 à 1:20, sendo que o ideal seria 1:2,5 ou até 1:2<sup>188</sup>. Sabe-se que em decorrência deste fato doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, processos inflamatórios e câncer são altamente prevalentes na população ocidental e não haverá proteção contra estas doenças se não houver redução da ingesta de PUFAS ômega-6, além do aumento do consumo de PUFAS ômega-3.

Wen et al.<sup>189</sup> utilizando PUFAS ômega-3 injetável, cinco vezes por semana por duas semanas, em camundongos submetidos à injeção prévia ectópica (flanco) de cultura de carcinoma de células escamosas humano, encontraram moderado efeito antiproliferativo tumoral, o qual foi potencializado com a associação de radioterapia. Este efeito parece ter sido mediado por PUFAS ômega-3, por causar inibição da expressão de COX-2, diminuição da expressão do gene antiapoptótico Bcl-2 e também por efeito antiangiogênico.

Elattar et al.<sup>190</sup> relataram diminuição dos níveis de prostaglandinas (PGE2, PGF2), sintetizadas por uma linhagem específica de carcinoma de células escamosas oral, quando administravam à mesma diferentes doses e tipos de PUFAS ômega-3. Sugerem efeito antiproliferativo tumoral, já que existe uma diminuição de prostaglandinas da série 2 que são pró-inflamatórias e pró-tumorais.

Palakurthi et al.<sup>155</sup> encontraram inibição da proliferação celular em linhagem de carcinoma de células escamosas humano transfectado em camundongos, em decorrência do uso de PUFAS ômega-3 (2,5g de EPA / kg de peso, por gavagem,

diariamente, por cinco semanas); as quais levaram a uma depleção das reservas de cálcio intracelular, o que interrompeu o ciclo celular em G1 e diminuiu a síntese e expressão das ciclinas de G1. Obtiveram efeito antitumoral com uma média de 100 mg de EPA, por dia, por animal.

No presente estudo, os animais do grupo 4-NQO 100 inicialmente recebiam um acréscimo de 10% de PUFAS ômega-3 na dieta convencional farelada. Em decorrência das reações cutâneas severas vistas neste grupo, reduziu-se a dose para 5% nos animais submetidos à indução prévia com 4-NQO 50. As cápsulas de 1 g de óleo de peixe continham 125 mg de DHA e 175 mg de EPA, além de 10 mg de vitamina E, a qual funciona como antioxidante poderoso, com a finalidade de neutralizar os radicais livres gerados por PUFAS ômega-3.

Nas dietas com 10% de acréscimo de óleo de peixe, os machos consumiam de 0,8 a 1,0 g de OP / dia / animal, ou seja, 100 – 125 mg de DHA, 140 – 175 mg de EPA e 8 – 10 mg de vitamina E (valores por dia, por animal). As fêmeas consumiam de 0,6 a 0,8 g de OP / dia / animal, ou seja, de 75 – 100 mg DHA, 105 – 140 mg de EPA e 6 – 8 mg de vitamina E (valores por dia, por animal).

Nas dietas com 5% de acréscimo de óleo de peixe, os machos consumiam de 0,4 a 0,5 g de OP / dia / animal, ou seja, 50 – 62,5 mg de DHA, 70 – 87,5 mg de EPA e 4 – 5 mg de vitamina E (valores por dia, por animal). As fêmeas consumiam de 0,3 a 0,4 g de OP / dia / animal, ou seja, de 37,5 – 50 mg DHA, 52,5 – 70 mg de EPA e 3 – 4 mg de vitamina E (valores por dia, por animal).

Neste estudo, apesar da dieta a 10% ter fornecido uma quantidade de EPA superior à oferecida por Palakurthi et al.<sup>155</sup>, os mesmos resultados antitumorais não

puderam ser reproduzidos na carcinogênese da VADS induzida por diferentes concentrações de 4-NQO.

Os resultados positivos encontrados na inibição da proliferação celular vistos por Palakurthi et al.<sup>155</sup>, os quais não foram vistos no presente estudo, podem dever-se a uma série de fatores. Inicialmente, os autores trabalharam com células tumorais transfectadas; neste trabalho a carcinogênese foi induzida quimicamente, assim, resultados distintos podem ser encontrados. Outro aspecto é o método de aplicação nos animais: por gavagem, quando as perdas são mínimas e o cálculo por animal é preciso, método este utilizado pelos autores em comparação. No presente trabalho, óleo de peixe foi misturado à ração, quando as perdas são inevitáveis e o cálculo preciso da quantidade de óleo de peixe ingerida por animal fica prejudicado pelo condicionamento em conjunto de animais, que apresentam pesos diferentes e condições de saúde distintas, o que interfere na quantidade de PUFAS ômega-3 ingerida por animal.

Dietas com acréscimo de 10 – 20 % de PUFAS ômega-3, balanceadas com uma proporção maior ou menor de ômega-6<sup>187</sup>, ou de fornecimento de PUFAS ômega-3 na dose de 1g/kg de peso corpóreo, foram testadas na literatura<sup>191,192</sup> As quantidades de EPA e DHA variam nas cápsulas de 1g.

Bonatto et al.<sup>191</sup> trabalharam com cápsulas de 1g contendo 180 mg de EPA, 120 mg de DHA e 2g de vitamina E em ratos Wistar (peso do adulto macho = 400 g). Era fornecida 1 g/kg de peso corpóreo, assim, cada animal consumiu, em média, 72 mg de EPA e 48 mg de DHA por dia. Como não trabalharam com adultos, a quantidade ingerida foi menor, mas proporcional à quantidade que seria vista nos mesmos. Observaram no trabalho redução da taxa de crescimento de linhagem de

tumores de mama inoculados nos animais. Ao comparar os resultados do trabalho de Bonatto et al.<sup>191</sup> com os do presente estudo, apesar de neste, uma ingesta de EPA e DHA ter sido oferecida em quantidades maiores na dieta de OP 10% e em quantidades equivalentes na dieta de OP 5%, o efeito antitumoral não pôde ser visto, em comparação ao observado naqueles.

A inibição de PUFAS ômega-3 no crescimento de células tumorais, tanto *in vitro*, como em tumores sólidos injetados em camundongos atímicos, foi demonstrada em uma série de linhagem de células tumorais e células transformadas principalmente em tumores de cólon<sup>193-197</sup>. Pode-se perceber que grande parte dos trabalhos existentes na literatura versa sobre a ação de PUFAS-ômega-3, nestes modelos explanados, ou seja, de tumores previamente implantados (enxerto ectópico), como visto até o momento.

A escassez de trabalhos publicados que testem a ação de PUFAS ômega-3 (óleo de peixe) na carcinogênese quimicamente induzida da VADS, em específico, da cavidade oral e do esôfago, dificulta a análise comparativa com os resultados deste estudo. Silva et al.<sup>198</sup> estudaram a ação quimiopreventiva de PUFAS na carcinogênese de pré-estômago de camundongos induzida por benzopireno. Encontraram ação antitumoral na fase de promoção da carcinogênese, principalmente nos animais que fizeram uso de dieta enriquecida com PUFAS ômega-3. Não foi avaliada carcinogênese oral ou esofágica, visto que 4-NQO foi fornecido por gavagem.

Baseado na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos, o uso das diferentes formas de quimioprevenção com PUFAS ômega-3 não foi benéfico em evitar, retardar ou suprimir a carcinogênese da VADS induzida pelo 4-

NQO. Assim, o óleo de peixe não auxiliou em conter a carcinogênese iniciada, especificamente, pelo 4-NQO. Além disto, a sugestiva ação pró-tumoral do óleo de peixe, quando aplicado apenas na pós-iniciação tumoral, parece mostrar que este ácido graxo pode potencializar a ação do 4-NQO no esôfago dos camundongos Swiss. Este achado precisa ser melhor estudado e validado em outros estudos.

Entretanto, não se pode descartar a ação do óleo de peixe em, eventualmente, ter atuação quimiopreventiva em outro modelo de CCECP ou de conter a carcinogênese de outros tipos de tumores descritos na literatura. Isto é justificado pelo seguinte fato: apesar de efeitos positivos de PUFAS ômega-3 serem relatados na literatura, o estudo em questão não conseguiu reproduzi-los.

#### 5.6 Análise da mortalidade entre grupos submetidos à quimioprevenção com agonista PPAR- $\gamma$ - pioglitazone e impacto da ação do mesmo na incidência de neoplasias da VADS

Durante o período de observação nos grupos controle e de quimioprevenção nos grupos em vigência da mesma, é esperada uma certa taxa de óbitos em função da progressão da carcinogênese. Além dos óbitos por câncer, é esperada uma taxa de óbitos em decorrência de outros fatores, como os ligados a outras doenças, fatores genéticos, à ação do 4-NQO e à ação isolada ou em conjunto do pioglitazone com o 4-NQO, que podem causar dano ou falência orgânica. No grupo 4NQO 100  $\rightarrow$  PPAR 300, a morte por outras causas que não as tumorais foi de 5,6%. Na comparação com o grupo controle que foi de 0%, não houve diferença estatística significativa. Também foi similar a morte por outras causas que não as tumorais na

comparação entre os grupos 4-NQO 50 → PPAR 100 (4,7%) e 4-NQO 50 + PPAR 100 → PPAR 100 (21%), na comparação com o grupo 4-NQO 50 (20,9%).

Neste estudo, ao se analisar as taxas de mortalidade por câncer em 24 semanas para o grupo que foi exposto à ação de 4-NQO 100 seguido de quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm e comparar com o grupo controle, observa-se uma diferença numérica, porém não estatística. No grupo sem quimioprevenção esta taxa chegou a 55,5% e no grupo com quimioprevenção ela foi de 38,8%, sem significância estatística. Ao final do período com a eutanásia de todos os animais, a taxa de neoplasia oral no grupo controle foi de 77,7% e no grupo com quimioprevenção foi de 61,1%. Já a taxa de neoplasia esofágica foi de 55,5% para o grupo controle e de 50% para o grupo com quimioprevenção, mostrando que o emprego 300 ppm de pioglitazone na dieta não trouxe nenhum benefício quimiopreventivo.

A incidência de neoplasia combinada ou não de esôfago e cavidade oral nos dois grupos foi exatamente a mesma: 88,8%. Ao considerar a neoplasia gástrica, a incidência de neoplasia invasora em pelo menos um órgão da via aerodigestiva superior chegou a 94,4% em ambos os grupos.

Ao avaliar apenas a incidência de carcinoma de células escamosas do pré-estômago, o grupo que realizou quimioprevenção com pioglitazone 300 ppm apresentou a maior incidência de todo o estudo – 27,7%. Na comparação com o grupo controle, que foi de 11,1%, não houve diferença estatisticamente significativa.

É importante citar que a maior concentração, em todo o estudo, de metástases à distância, é a do grupo que recebeu 300 ppm de pioglitazone, as quais vinham acompanhadas de volumosos tumores gástricos. É interessante observar que, apesar da ausência de significância estatística, a formação de tumores gástricos de extrema

agressividade, volumosos, com invasão de serosa ou de órgãos adjacentes e com disseminação celomática, que levaram a múltiplas metástases pulmonares e hepáticas, ocorreu apenas nos grupos com pioglitazone, especialmente no grupo 4-NQO 100 → PPAR 300. Dois camundongos do grupo pioglitazone 300 ppm apresentaram metástases hepáticas. Um destes animais também apresentou metástases pulmonares. Assim, o grupo 4-NQO 100 → PPAR 300 desenvolveu uma quantidade de tumores gástricos invasores e de extrema agressividade maior que o grupo 4-NQO 100. Além do mais, a presença de metástases à distância apenas no grupo 4-NQO 100 → PPAR 300 demonstra que algo além do 4-NQO interfere na apresentação clínica da doença e no modelo de progressão da carcinogênese. Acredita-se que, de alguma forma, o uso do agonista PPAR- $\alpha$  – pioglitazone, na dose de 300 ppm, pode ter criado um novo modelo de carcinogênese gástrica por ativar PPAR- $\alpha$  em tumores gástricos que expressam o mesmo oriundos da exposição prévia ao 4-NQO. A ativação do PPAR- $\alpha$ , neste órgão, especificamente, pode ter sido a responsável, de alguma forma, por apresentação tão peculiar de carcinogênese gástrica.

Diversos trabalhos na literatura mostram que agonistas PPAR- $\alpha$  têm efeitos antitumorais em alguns órgãos e tumores, mas, em outros, apresentam efeitos pró-tumorais, o que justificaria nestes o uso de antagonistas do PPAR- $\alpha$ .

Na tentativa de minimizar a criação de carcinogênese gástrica tão incomum e agressiva que pode ter sido uma combinação de dose elevada de 4-NQO com dose elevada de pioglitazone, procurou-se não apenas reduzir a dose de 4-NQO para 50  $\mu$ g/ml, mas também de pioglitazone para 100 ppm. Assim, criou-se um grupo em que a quimioprevenção com pioglitazone foi testada nas fases de iniciação e promoção

tumorais, além da testada na fase de promoção tumoral apenas – na mesma linha do que havia sido realizado anteriormente com o óleo de peixe.

Na análise comparativa das taxas de mortalidade por câncer em 24 semanas para os grupos que foram expostos à ação de 4-NQO 50 e de quimioprevenção com pioglitazone 100 ppm com o grupo controle, observa-se uma diferença numérica, porém não estatística. No grupo sem quimioprevenção esta taxa chegou a 11,6% e no grupo com quimioprevenção apenas na promoção tumoral foi de 19%, enquanto no grupo com quimioprevenção na iniciação e promoção tumorais ela foi de 15,7%. Ao final do período com a eutanásia de todos os animais, a taxa de neoplasia oral no grupo controle foi de 72,9% enquanto que no grupo com quimioprevenção na promoção e naquele com quimioprevenção na iniciação e promoção tumorais foram, respectivamente, de 76,1% e de 62,5%. Já a taxa de neoplasia esofágica foi de 37,8% para o grupo controle; de 57,1% para o grupo com pioglitazone na promoção tumoral e de 31,2% para o grupo com pioglitazone na iniciação e promoção tumorais, mostrando que o emprego de 100 ppm de pioglitazone na dieta não trouxe nenhum benefício quimiopreventivo, pelo contrário, verificando-se que algumas taxas de mortalidade e de incidência de tumores foram menores para o grupo controle.

O mesmo pôde ser constatado na incidência de neoplasia combinada ou não de esôfago e cavidade oral, cuja incidência no grupo controle foi de 83,7%, enquanto que nos grupos com quimioprevenção na promoção tumoral foi de 90,4% e de quimioprevenção na iniciação e promoção tumorais foi de 68,7%. Ao considerar a neoplasia gástrica em conjunto com as demais, a incidência de neoplasia invasora em pelo menos um órgão da via aerodigestiva superior foi a mesma que a combinada para cavidade oral e/ou esôfago para o grupo controle e para o grupo com



quimioprevenção apenas na promoção tumoral; mas subiu para 81,2% para o grupo com quimioprevenção na iniciação e promoção tumorais, já que neste grupo, alguns animais fizeram neoplasia gástrica exclusiva.

Ao avaliar apenas a incidência de carcinoma de células escamosas do pré-estômago, o grupo que realizou quimioprevenção com pioglitazone na promoção e iniciação tumorais apresentou a maior incidência entre os três grupos – 18,7%. Na comparação com o grupo controle, que foi de 13,5% e com o grupo com quimioprevenção apenas na promoção tumoral que foi de 9,5%, não houve diferença estatisticamente significativa. Apesar de ter-se conseguido minimizar o aparecimento de tumores gástricos tipo *linite plástica* com a redução das doses de 4-NQO e de pioglitazone, na comparação com o grupo controle que apresentou apenas um tumor gástrico volumoso, os grupos com quimioprevenção com pioglitazone apresentaram três com este padrão. Um destes três apresentou padrão de disseminação celomática com extensa invasão diafragmática, renal, esplênica e até testicular; semelhante ao visto no grupo 4NQO 100 → PPAR 300. Outro apresentou múltiplas metástases hepáticas. Metástases à distância também foram vistas em um animal que realizou quimioprevenção, que apresentava grande tumor esofágico, mas com pré-estômago normal. Nenhuma metástase a distância foi comprovada no grupo controle.

Assim, mesmo existindo uma diferença na incidência de câncer gástrico entre os grupos, não se sabe ao certo se isto foi apenas ação do pioglitazone ou da associação do mesmo com doses altas de 4-NQO, visto que os grupos controle do presente estudo também apresentaram carcinogênese gástrica. Outro fato que corrobora a provável não participação isolada do pioglitazone na carcinogênese gástrica é uma incidência de 0% de tumores na mucosa da VADS no grupo que

apenas recebeu 300 ppm de pioglitazone. Talvez mais importante que a eventual ação isolada pró-tumoral de pioglitazone no pré-estômago seja a combinação agonista PPAR- $\gamma$  e 4-NQO, a qual possa ter criado, conforme já citado, tumores gástricos de apresentação clínica apenas vista quando esta associação estava presente. Apesar da falta de significância estatística deste dado, a simples observação da maior frequência de tumores gástricos, todos extremamente agressivos, de apresentação clínica atípica, exclusiva com esta associação, chama a atenção.

Estudos *in vitro* e em modelos animais<sup>126,135,139,141,148,199,200</sup> têm mostrado que o tratamento do câncer com os ligantes do PPAR- $\gamma$ , como as tiazolidinedionas (troglitazone, rosiglitazone e pioglitazone), ou com os ligantes naturais pode induzir diferenciação celular e apoptose, sugerindo uma aplicação potencial destas drogas como agentes quimiopreventivos em diferentes tipos de neoplasias.

Estudos *in vitro* de linhagem de carcinoma de células escamosas oral, com uso de agonistas de PPAR- $\gamma$  ou de outros ligantes de PPAR- $\gamma$  como retinoides, 15-PGJ2 e, até, de anti-inflamatórios como sulindac, que parece atuar por esta via além da conhecida COX-2, mostraram inibição da proliferação celular, por vias dependente ou não de PPAR- $\gamma$ <sup>146,147,149,151,152</sup>. Alguns autores também mostraram benefícios, mas em modelos animais, na carcinogênese oral, desencadeada pelo 4-NQO, com o uso de agonista PPAR- $\gamma$ <sup>201</sup>.

Yoshida et al.<sup>201</sup> relataram que a suplementação de troglitazone por 22 semanas, um agonista PPAR- $\gamma$ , inibiu a carcinogênese oral induzida pelo uso de 4-NQO 20 ppm na água por oito semanas, na fase de promoção, e este evento está relacionado com a supressão da proliferação celular e da expressão de COX-2. Encontraram uma menor incidência de displasia severa – 15% e de carcinoma de

células escamosas oral – 5% nos animais tratados com 100 ppm de troglitazone em comparação com o grupo que não recebeu quimioprevenção, que apresentou uma incidência de displasia severa de 62,5% e de carcinoma de células escamosas oral de 45,8%.

Ao se comparar com 77,7% de incidência de neoplasia oral no grupo 4-NQO 100 e de 72,9% no grupo 4-NQO 50, uma incidência de tumores muito inferior, no grupo controle, é observada no trabalho de Yoshida et al.<sup>201</sup> – 45,8%. Um dos fatores que poderia justificar esta diferença é o fato destes autores terem utilizado uma dose baixa de 4-NQO – 20 µg/ml – em comparação com este estudo, que utilizou 100 µg/ml e 50 µg/ml. Ao se realizar quimioprevenção, a incidência de neoplasia oral no grupo de Yoshida et al.<sup>201</sup> foi de 5%, enquanto que a deste trabalho foi de 61,1% para o grupo 4-NQO 100; de 76,1% para o grupo 4-NQO 50 com quimioprevenção apenas na promoção tumoral e de 62,5% quando quimioprevenção foi aplicada na iniciação e promoção tumorais. Apesar de existir a possibilidade de superestimar o efeito da quimioprevenção, em função de um modelo que induza pouca neoplasia, o grupo controle de Yoshida et al.<sup>201</sup> diz o contrário. Apesar de pouco mais de 50% de animais do grupo controle terem desenvolvido neoplasia oral, a diferença para o grupo com 100 ppm de troglitazone foi estatisticamente significativa, o que mostra um efeito antitumoral deste agonista PPAR- $\gamma$  não encontrado no estudo em questão com o uso de 300 ppm ou de 100 ppm de pioglitazone.

Yoshida et al.<sup>201</sup> não relataram a presença de neoplasia esofágica ou gástrica. Acredita-se que ela não tenha se formado, visto à baixa dose de 4-NQO fornecida e ao tempo curto de observação ou de quimioprevenção a que os animais foram expostos, se for considerada a dose do carcinógeno utilizada. Talvez esta tenha sido a

intenção destes autores – induzir apenas carcinogênese oral estudando a ação de agonista PPAR- $\gamma$ , sem a interferência de tumores outros como os esofágicos, para isto utilizando uma dose baixa de 4-NQO, com eutanásia dos animais programada para depois de 22 semanas do término da indução tumoral.

No estudo de Yoshida et al.<sup>201</sup>, a suplementação com troglitazone reduziu a expressão de biomarcadores da proliferação celular como o índice de bromodeoxiuridina e de ciclina D1. Os achados de dosagem de PPAR- $\gamma$  por imunohistoquímica na mucosa dos grupos controle e dos grupos que receberam 4-NQO mostram que a expressão de PPAR- $\gamma$  pode ter sido aumentada pelo uso do 4-NQO, o que facilitou a ação do troglitazone. Também foi encontrada uma diminuição de expressão de COX-2 nas lesões tumorais orais causadas pelo troglitazone; o que leva a crer que esta tiazolidinediona inibiu a carcinogênese oral também por diminuir a atividade enzimática de COX-2. Outros trabalhos já haviam relatado um efeito inibitório dos ligantes de PPAR- $\gamma$  na expressão<sup>202</sup> e na atividade transcricional de COX-2<sup>203</sup>.

Outros aspectos, além dos já colocados, podem ter feito com que os resultados do trabalho em questão em muito diferissem dos de Yoshida et al.<sup>201</sup>.

Em primeiro lugar, a carcinogênese induzida por 100  $\mu\text{g/ml}$  e até com 50  $\mu\text{g/ml}$  no presente estudo foi mais severa e rápida, o que pode não ter possibilitado um tempo de ação necessário para a devida atuação do pioglitazone.

Em último lugar, as drogas comparadas entre os estudos são diferentes, apesar de ambas serem agonistas PPAR- $\gamma$ ; logo, resultados distintos podem ser esperados.

Yoshida et al.<sup>201</sup> relatam que os ratos consumiam em média 16,4 a 17,6 g / ração / dia, o que levava a um consumo médio de troglitazone de 1,09 a 1,17 mg / dia

/ animal. Os camundongos do grupo 4-NQO 100 → PPAR 300 do estudo em questão consumiram de 8 a 10 gramas de ração ao dia (machos), e 6 a 8g (fêmeas), o que gerou uma ingesta média de pioglitazone na dose de 300 ppm de 2,4 a 3,0 mg / animal / dia em machos e 1,8 a 2,4 mg / animal / dia em fêmeas. Já os animais que consumiram 100 ppm de pioglitazone tiveram uma ingesta média do mesmo de 0,8 a 1,0 mg / animal / dia em machos e 0,6 a 0,8 mg / animal / dia em fêmeas.

Com estes dados é possível observar que apesar dos animais da pesquisa em questão terem ingerido, proporcionalmente, mais agonista PPAR-? quando a dose de 300 ppm era fornecida e uma quantidade similar do mesmo quando 100 ppm era fornecida, em comparação aos animais do estudo de Yoshida et al.<sup>201</sup>, efeitos antitumorais apenas foram vistos no estudo destes autores. Vale lembrar que o método de administração da medicação foi semelhante entre os dois trabalhos. A medicação era masserada na ração, semanalmente, sendo, após, a mesma solidificada, e fornecida aos animais. Não houve, em ambos os estudos, um controle preciso de ingesta de medicação, por animal, por dia. Os valores são aproximados.

Existem trabalhos na literatura que mostram ausência de ação antitumoral de certos ligantes de PPAR-?, em linhagem celular de carcinoma de células escamosas oral, como o de Nikitakis et al.<sup>152</sup>, ao estudar rosiglitazone e ciglitazone, e de Fukuchi et al.<sup>147</sup> com troglitazone. Talvez a ausência de efeitos antitumorais vista neste trabalho com pioglitazone possa ser corroborada pelos autores agora citados, apesar de nenhum deles ter estudado o pioglitazone.

Outros autores enfatizam a ineficácia de agonistas PPAR-? ou eventual ação pró-tumoral destes agonistas<sup>204</sup>. Também há na literatura que o uso de antagonistas e

não agonistas de PPAR- $\gamma$  é que apresenta efeito antitumoral em cultura de carcinoma de células escamosas oral e esofágico<sup>165,205</sup>.

Em camundongos MIN – animais suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasia colônica –, com a ativação de PPAR- $\gamma$  por seus ligantes sintéticos, houve aumento da frequência e tamanho dos tumores de cólon, sugerindo que a inibição da carcinogênese modulada por PPARs depende de situações específicas<sup>204</sup>. Não se sabe ao certo se estas ações ocorrem apenas nas células tumorais ou também em células normais – raciocínio este que pode ser feito ao se analisar o modelo de carcinogênese gástrica criado pelo estudo em questão.

Takahashi et al.<sup>165</sup> relataram que o uso de antagonistas e não de agonistas de PPAR- $\gamma$  em altas doses inibiu o crescimento celular e induziu apoptose de diferentes linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de esôfago.

Schaefer et al.<sup>206</sup> relataram que PPAR- $\gamma$  está superexpresso em carcinoma hepatocelular e que os inibidores de PPAR- $\gamma$  interferem com a adesão celular levando à apoptose (*anoikis*) em duas linhagens celulares de carcinoma hepatocelular.

Masuda et al.<sup>205</sup> encontraram PPAR- $\gamma$  superexpresso em linhagem celular de carcinoma de células escamosas oral e em tecidos provenientes de carcinoma de células escamosas oral de humanos no sítio primário e nos linfonodos metastáticos. Em contrapartida, não encontraram expressão em tecido lingual humano normal. Ao utilizarem antagonistas específicos de PPAR- $\gamma$  em cultura tumoral, observaram que os mesmos foram capazes de inibir o crescimento do tumor, por induzirem apoptose em carcinoma de células escamosas oral, ao interferirem com a adesão celular à matriz extracelular e por causarem interferência nos sinais de sobrevivência

(*anoikis*). Além disto, estes antagonistas inibiram a invasão do carcinoma de células escamosas. Todas estas ações comprovadamente aconteceram por bloqueio de PPAR- $\alpha$ . Já o uso de agonistas do PPAR- $\alpha$  nestas culturas de carcinoma de células escamosas oral não alterou o índice de crescimento celular tumoral. Sugerem que antagonistas de PPAR- $\alpha$  podem ter um uso potencial no tratamento do carcinoma de células escamosas oral e na prevenção da invasão tumoral e da metastatização.

Se estas considerações podem ser extrapoladas para o estudo em questão, frente aos resultados ausentes para carcinogênese oral e esofágica, e, até certo ponto, negativos para a carcinogênese gástrica, carece de maiores comprovações.

A habilidade que agonistas PPAR- $\alpha$  têm *in vivo* de inibir ou promover a carcinogênese deve-se à estimulação de caminhos antiproliferativos e apoptóticos ou proliferativos e antiapoptóticos, dependendo das condições celulares. Estes achados levaram à ideia de moduladores seletivos de PPAR- $\alpha$  (SPARMs), drogas análogas aos moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERMs), quando ações distintas do modulador dependem do contexto celular e de conformações distintas do receptor e, assim, de interações gênicas distintas.

Ácidos graxos (PUFAS) podem ser considerados SPARMs naturais, já que sua ligação não necessariamente leva à ativação de PPARs e consequente transcrição gênica<sup>159</sup>. Estas considerações levantam a possibilidade de que as alterações causadas por determinados tipos de ácidos graxos em determinados tecidos podem alterar a atividade de PPAR- $\alpha$  e, conseqüentemente, os tipos de genes por este controlados, para obterem seus efeitos.

Resultados tão controversos quanto à ação dos agonistas de PPAR- $\alpha$  podem ser devido ao uso de diferentes doses entre os estudos (doses maiores resultaram em

resposta efetiva) e do uso de algumas tiazolidinedionas de baixa especificidade de ligação, como o troglitazone, nos estudos onde não houve bons resultados no controle do crescimento tumoral. Além deste fato, boa parte pesquisou os efeitos dos agonistas de PPAR- $\gamma$  e não dos antagonistas como Masuda et al.<sup>205</sup>.

O mecanismo pelo qual a expressão de PPAR- $\gamma$  estaria correlacionada com ação anti-tumoral em carcinoma de células escamosas de esôfago é semelhante ao até agora exposto para carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

Apesar de 300 ppm ou 100 ppm de pioglitazone na dieta dos animais deste estudo não terem trazido benefícios para conter a carcinogênese esofágica, certos autores relatam a ação antitumoral das tiazolidinedionas (troglitazone e pioglitazone) em diferentes linhagens celulares tumorais de CCE esofágico humano<sup>163,164</sup>.

Rumi et al.<sup>207</sup>, estudando a ação de troglitazone, pioglitazone ou 15-PGJ<sub>2</sub>, em culturas celulares de carcinoma de células escamosas de esôfago, encontraram uma inibição do crescimento tumoral com parada do ciclo celular em G1. Esta interrupção do ciclo, vista com o uso de troglitazone, poderia estar relacionada com o aumento de p18, p21 e p27 – inibidores de quinase dependente de ciclina (CDK) – e pelo aumento da expressão de interleucina-1-alfa, uma citocina com atividade imunitária antitumoral.

Takashima et al.<sup>208</sup>, examinando biópsias obtidas de pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago, observaram que 73,9% dos tumores expressavam PPAR- $\gamma$ , em especial os pouco diferenciados. Os ligantes de PPAR- $\gamma$ , troglitazone e prostaglandina J<sub>2</sub>, significativamente e dose-dependente, inibiram a proliferação tumoral *in vitro* e *in vivo*, exceto em duas linhagens bem diferenciadas, quando a



expressão de PPAR- $\gamma$  era menor. Um dos mecanismos de ação foi através da indução da apoptose.

Não há na literatura nenhum trabalho analisando ação quimiopreventiva de agonistas PPAR- $\gamma$  na carcinogênese de pré-estômago de camundongos induzida por carcinógenos como o 4-NQO ou por outros compostos nitrosos. Assim como não há relato na literatura implicando a formação de tumores gástricos (CCE) com agonistas PPAR- $\gamma$  em roedores.

A variedade de resultados encontrados na literatura em relação à ação de agonistas PPAR- $\gamma$ , ora exibindo efeitos antitumorais positivos, ora exibindo efeitos antitumorais negativos, em CCE e outros tumores, carece de maiores estudos em animais de laboratório. Diferentes doses, drogas e ligantes naturais necessitam ser testados. É importante, também, estimar a expressão de PPAR- $\gamma$  nos tecidos normais e tumorais, para saber se as ações das substâncias testadas, se presentes, são totalmente dependentes ou não de PPAR- $\gamma$ .

Baseado na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos, o uso das diferentes formas de quimioprevenção com pioglitazone não foi benéfico em evitar, retardar ou suprimir a carcinogênese da VADS induzida pelo 4-NQO. Assim, pioglitazone não auxiliou em conter a carcinogênese iniciada, especificamente, pelo 4-NQO. Além disto, a associação do pioglitazone com 4-NQO levou à formação de carcinogênese gástrica inusitada em pré-estômago de camundongos Swiss e que, apesar de não ter havido significância estatística, jamais foi descrita na literatura.

Entretanto, não se pode descartar a ação do pioglitazone em, eventualmente, ter atuação quimiopreventiva ou, até, pró-tumoral em outro modelo de CCECP ou de conter ou não a carcinogênese de outros tipos de tumores descritos na literatura. Isto

é justificado pelo seguinte fato: apesar de alguns autores relatarem efeitos antitumorais de agonistas PPAR- $\alpha$ , outros relatam efeitos pró-tumorais.

## 5.7 Perspectivas futuras

É importante citar que o modelo de indução da carcinogênese da VADS em camundongos Swiss com 4-NQO necessita ser reestruturado ao se estudar outros eventuais agentes com potencial quimiopreventivo. Apesar dos resultados negativos encontrados com óleo de peixe e pioglitazone neste trabalho, novas pesquisas testando outros agentes, neste modelo de carcinogênese da VADS quimicamente induzida por 4-NQO, se fazem necessárias. Acredita-se que isto possa ter ocorrido, em parte, por indução de uma carcinogênese demasiadamente potente, tanto com 100  $\mu\text{g/ml}$  como com 50  $\mu\text{g/ml}$  de 4-NQO. Logo, a dose empregada de 4-NQO pode ter interferido nos resultados de quimioprevenção do óleo de peixe ou do pioglitazone encontrados neste trabalho. A redução da dose do 4-NQO pode levar a uma carcinogênese mais lenta, o que poderia possibilitar tempo de ação de outros agentes de quimioprevenção a serem testados.

## 6 CONCLUSÃO

Baseado na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos, o uso das diferentes formas de quimioprevenção com óleo de peixe (na pós-iniciação tumoral com 5% ou 10% e na iniciação e pós-iniciação tumorais com 5%) não foi benéfico em evitar, retardar ou suprimir a carcinogênese da VADS induzida por doses distintas de 4-NQO. Além disto, a sugestiva ação pró-tumoral do óleo de peixe, quando aplicado apenas na pós-iniciação tumoral, parece mostrar que este ácido graxo pode potencializar a ação do 4-NQO no esôfago dos camundongos Swiss. Este achado precisa ser melhor estudado e validado em outras pesquisas.

Da mesma forma que descrito acima, o uso das diferentes formas de quimioprevenção com pioglitazone (na pós-iniciação tumoral com 300 ppm ou 100 ppm e na iniciação e pós-iniciação tumorais com 100 ppm) não foi benéfico em evitar, retardar ou suprimir a carcinogênese da VADS induzida por doses distintas de 4-NQO. Finalizando, acredita-se que, de alguma forma, este experimento tenha induzido, em camundongos Swiss, um modelo de carcinogênese gástrica jamais visto apenas com 4-NQO, através da ativação de PPAR- $\gamma$  pelo pioglitazone, em animais submetidos à exposição prévia com 4-NQO 100  $\mu$ g/ml ou com 4-NQO 50  $\mu$ g/ml.

## ANEXOS

Composição da ração farelada Nuvilab CR-1 da Nuvital:

1 - **Componentes:** carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivo antioxidante;

2 - **Vitaminas** (por kg não menos que): vitamina A 12.000 UI, vitamina D3 1800 UI, vitamina E 30 mg, vitamina K<sub>3</sub> 3 mg, vitamina B<sub>1</sub> 5 mg, vitamina B<sub>2</sub> 6 mg, vitamina B<sub>6</sub> 7 mg, vitamina B<sub>12</sub> 20 mg, niacina 60 mg, ácido pantotênico 20 mg, ácido fólico 1 mg, biotina 0,056 mg;

3 - **Microelementos minerais:** ferro 50 mg, zinco 60 mg, cobre 10 mg, iodo 2 mg, manganês 60 mg, selênio 0,05 mg, cobalto 1,50 mg;

4 - **Aminoácidos:** DL-metionina 300 mg, lisina 100 mg;

5 - **Aditivos:** antioxidante 100 mg;

6 - **Níveis de garantia:** umidade máxima 12,5%, proteína bruta mínima 22%, extrato etéreo mínimo 4%, material mineral máximo 10%, matéria fibrosa máxima 8%, cálcio máximo 1,40%, fósforo mínimo 0,80%.

## REFERÊNCIAS

- 1- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.
- 2- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225-49.
- 3- Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.
- 4- Vikram B. Adjuvant therapy in head and neck cancer. *CA Cancer J Clin.* 1998;48:199-209.
- 5- Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin.* 1995;45:352-68.
- 6- Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer.* 2005;114:806-16.
- 7- Murphy GP, Lenhardt LW. *American Cancer Society textbook of clinical oncology.* 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 1995.
- 8- Day GL, Blot WJ. Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer.* 1992;70:14-9.
- 9- Lippman SM, Hong WK. Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989;17:691-4.
- 10- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001;345:1890-900.
- 11- Lu SL, Herrington H, Wang XJ. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head & Neck.* 2006;28:945-54.
- 12- Vered M, Yarom N, Dayan D. 4-NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncology.* 2005;41:337-9.
- 13- Slaughter DP, Southwick HW, Smejka W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium - clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6:963-8.

- 14- Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW. ABT-510 Is an Effective Chemopreventive Agent in the Mouse 4-Nitroquinoline 1-Oxide Model of Oral Carcinogenesis. *Cancer Prev Res*. 2009 Apr;2(4):385-93.
- 15- Kelloff GJ, Lippman SM, Dannenberg AJ et al. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer – a plan to move forward. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3661-97.
- 16- Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An Orthotopic Nude Mouse Model of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2002 Jan;8:293-8.
- 17- Kim S. Animal Models of Cancer in the Head and Neck Region. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*. 2009 Jun;2(2):55-60.
- 18- Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res*. 1954;33(2):253-62.
- 19- Nakahara W, Fukuoka F, Sugimura T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gann*. 1957;48:129.
- 20- Baker S. Malignant neoplasms of the oral cavity. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Schuller DE (eds.). *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. St.Louis, MO: CV Mosby; 1986. p.1281-343.
- 21- Hawkins BL, Heniford B, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head & Neck*. 1994;16:424-32.
- 22- Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia: the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995;24:53-8.
- 23- MacDonald DG. Comparison of epithelial dysplasia in hamster cheek pouch carcinogenesis and human oral mucosa. *J Oral Pathol*. 1981;10:186-91.
- 24- Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*. 2006;42:655-67.
- 25- Venkat JA, Shami S, Davis K, Nayak M, Plimmer JR, Pfeil R, Nair PP. Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by a modified SOS microplate assay. *Environ Mol Mutagen*. 1995:67-76.
- 26- Nunoshiba T, Demple B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res*. 1993;53:3250-2.

- 27- Miao ZH, Rao A, Agama K, Antony S, Kohn KW, Pommier Y. 4-Nitroquinoline-1-Oxide Induces the Formation of Cellular Topoisomerase I-DNA Cleavage Complexes. *Cancer Res.* 2006;66(13):6540-5.
- 28- Ramotar D, Belanger E, Brodeur I, Masson JY, Dro-betsky EA. A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4 nitroquinoline 1- oxide. *J Biol Chem.* 1998;273:21489-96.
- 29- Kim MM, Glazer CA, Mambo E et al. Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO. *Oral Oncol.* 2006;42:201-7.
- 30- Steidler NE, Reade RC. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. *J Oral Pathol.* 1986;15:43-7.
- 31- Yuan B, Heniford BW, Ackermann DM, Hawkins BL, Hendier FJ. Harvey *ras* (*H-ras*) Point Mutations Are Induced by 4-Nitroquinoline-1-oxide in Murine Oral Squamous Epithelia, while Squamous Cell Carcinomas and Loss of Heterozygosity Occur without Additional Exposure. *Cancer Research.* 1994 Oct;54:5310-7.
- 32- Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head & Neck.* 1996;18:441-9.
- 33- Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clinical Cancer R.* 2004 Jan;10:301-13.
- 34- Tanuma J, Shisa H, Hiai H, Higashi S, Yamada Y, Kamoto T et al. Quantitative Trait Loci Affecting 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced Tongue Carcinogenesis in the Rat. *Cancer Research.* 1998 Apr;58:1660-4.
- 35- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA damage repair and mutagenesis. *ASM Press.* 1995:1-58.
- 36- Benson AM. Conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide by a dicumarol-resistant hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice. *Biochem Pharmacol.* 1993;46(7):1217-21.
- 37- Fronza G, Campomenosi P, Iannone R, Abbondandolo A. The 4-nitroquinoline-1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(6):1283-7.
- 38- Morrow CS, Diah S, Smitherman PK, Schneider E, Townsend AJ. Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline-1-oxide toxicity. *Carcinogenesis.* 1998;19(1):109-15.

- 39- Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, Dicker AJ, Saunders NA. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res.* 2002;62:3759-65.
- 40- Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res.* 1999;78(6):1264-9.
- 41- Ribeiro DA, Salvadori DMF, Marques MEA. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Path.* 2005;86:375-81.
- 42- Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002;38:562-73.
- 43- Ribeiro DA, Favero Salvadori DM, Silva RN, Ribeiro Darros B, Alencar Marques ME. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2004;40(9):910-5.
- 44- Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA, Gutkind JS. Targeting Mammalian Target of Rapamycin by Rapamycin Prevents Tumor Progression in an Oral-Specific Chemical Carcinogenesis Model. *Cancer Prev Res.* 2009 Jan;2(1):27-36.
- 45- Wong KK. Oral-Specific Chemical Carcinogenesis in Mice: An Exciting Model for Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res.* 2009 Jan;2(1):10-3.
- 46- Niwa S, Ueno S, Shirasu R. Alteration of pRb expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol.* 2001 Oct;37(7):579-85.
- 47- Fujino H, Chino T, Imai T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline-N-oxide. *J Nat Cancer Inst.* 1965;35:907.
- 48- Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy.* 1973;24:39-48.
- 49- Wong PCN, Wilson DF. 4-Nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in the rat palate. *J Oral Maxillofac Surg.* 1983;12:375-84.
- 50- Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol.* 1997;33:105-9.
- 51- Vitale-Cross L, Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA, Gutkind JS. Chemical Carcinogenesis Models for Evaluating Molecular-Targeted Prevention and Treatment of Oral Cancer. *Cancer Prev Res.* 2009 May;2(5):419-22.



- 52- von Pressentin MM, Kosinska W, Guttenplan JB, Mutagenesis induced by oral carcinogens in lacZ mouse (Muta Mouse) tongue and other oral tissues. *Carcinogenesis*. 1999;20(11):2167-70.
- 53- Zhang Z, Wang Y, Yao R, Lubet RA, You M. p53 Transgenic Mice Are Highly Susceptible to 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Oral Cancer. *Mol Cancer Res*. 2006 Jun;4(6):401-10.
- 54- Miyamoto S, Yasui Y, Kim M, Sugie S, Murakami A, Ishigamori-Suzuki R et al. A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that is highly susceptible to 4NQO-induced tongue and esophageal carcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):418-26.
- 55- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*. 1976;35:1332-8.
- 56- Lippman SM, Benner SE, Hong WK. Cancer Chemoprevention. *Journal of Clinical Oncology*. 1994 Apr;12(4):851-73.
- 57- Hong WK, Spitz MR, Lippman SM. Cancer Chemoprevention in the 21st Century: Genetics, Risk Modeling, and Molecular Targets. *Journal of Clinical Oncology*. 2000 Nov;18(21s suppl):9s-18s.
- 58- Naithani R, Huma LC, Moriarty RM, McCormick DL, Mehta R. Comprehensive Review of Cancer Chemopreventive Agents Evaluated in Experimental Carcinogenesis Models and Clinical Trials. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(11):1044-71.
- 59- Hong WK, Sporn MB. Recent Advances in Chemoprevention of Cancer. *Science*. 1997 Nov;278:1073-7.
- 60- Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83:841-50.
- 61- Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK. Suppression of retinoic acid receptor - beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med*. 1995;332(21):1405-10.
- 62- Gudas LJ. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds.). *The Retinoids*. 2.ed New York: Raven; 1994. p.443-520.
- 63- Hong WK, Endicott J, Itri LM et al. 13-*cis*-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med*. 1986;315:1501-5.
- 64- Hong WK, Lippman SM, Itri LM et al. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1990;323:795-801.

- 65- Lippman SM, Lee JJ, Karp DD et al. Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage-I non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:605-18.
- 66- Khuri FR, Lee JJ, Lippman SM et al. Randomized phase III trial of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:441-50.
- 67- Khuri FR, Shin DM. Head and Neck Cancer Chemoprevention Gets a Shot in the Arm. *Journal of Clinical Oncology.* 2008 Jan;26(3):345-7.
- 68- Shin DM, Khuri FR, Murphy B, Garden AS, Clayman G, Francisco M et al. Combined Interferon-Alfa, 13-*cis* -Retinoic Acid, and Alpha- Tocopherol in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Novel Bioadjuvant Phase II Trial. *J Clin Oncol.* 2001;19:3010-7.
- 69- Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L et al. Podoplanin: A Novel Marker for Oral Cancer Risk in Patients With Oral Premalignancy. *J Clin Oncol.* 2008;26:354-60.
- 70- Garewal HS, Meyskens FL, Killen D, Reeves D, Kiersch TA, Elletson H et al. Response of Oral Leukoplakia to Beta-Carotene. *J Clin Oncol.* 1990;8:1715-20.
- 71- Mayne ST, Cartmel B, Baum M, Shor-Posner G, Fallon BG, Briskin K et al. Randomized Trial of Supplemental beta-Carotene to Prevent Second Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2001 Feb;61:1457-63.
- 72- Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Okamoto K, Mon H, Hara A. Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide induced Oral Carcinogenesis by Dietary Protocatechuic Acid during Initiation and Postinitiation Phases. *Cancer Res.* 1994 May;54:2359-65.
- 73- Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H et al. Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide induced Oral Carcinogenesis by Dietary Curcumin and Hesperidin: Comparison with the Protective Effect of  $\beta$ -Carotene. *Cancer Res.* 1994 Sep;54:4653-9.
- 74- Tanaka T, Makita T, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A et al. Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide induced Oral Carcinogenesis in Rats by Flavonoids Diosmin and Hesperidin, Each Alone and in Combination. *Cancer Res.* 1997 Jan;57:246-52.
- 75- Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, El-Bayoumy K. 1,4-Phenylenebis (methylene) selenocyanate Exerts Exceptional Chemopreventive Activity in Rat Tongue Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1997 Sep; 57:3644-8.

- 76- Tanaka T, Kawabata K, Mori H, Murakami A, Kuki W, Takahshi Y et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral carcinogenesis by *citrus auraptene* in rats. *Carcinogenesis*. 1998;19(3):425-31.
- 77- Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2002;23(8):1361-7.
- 78- Yanaida Y, Kohno H, Yoshida K, Hirose Y, Yamada Y, Mori H et al. Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):787-94.
- 79- Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Akira Hara A et al. Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide induced Rat Oral Carcinogenesis by the Dietary Flavonoids Chalcone, 2-Hydroxychalcone, and Quercetin. *Cancer Res*. 1996 Nov;56:4904-10.
- 80- Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999;20:2209-18.
- 81- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther*. 1999;83:217-44.
- 82- Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr*. 2002;132:3508S-12S.
- 83- Rose DP, Connolly JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res*. 1990;50:7139-44.
- 84- Robinson LE, Clandinin MT, Field CJ. R3230AC rat mammary tumor and dietary long-chain (n-3) fatty acids change immune cell composition and function during mitogen activation. *J Nutr*. 2001;131:2021-7.
- 85- Karmali RA, Terano T, Cohen LA et al. The effects of dietary n-3 fatty acids on the DU-145 transplantable human prostatic tumor. *Anticancer Res*. 1987;7:1173-80.
- 86- Calviello G, Palozza P, Piccioni E et al. Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer*. 1998;75:699-705.
- 87- O'Connor TP, Roebuck BD, Peterson FJ et al. Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on development of azaserine induced preneoplastic lesions in rat pancreas. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:858-63.

- 88- Clarke RG, Lund EK, Latham P et al. Effect of eicosapentaenoic acid on the proliferation and incidence of apoptosis in the colorectal cell line HT29. *Lipids*. 1999;34:1287-95.
- 89- Hawkins RA, Sangster K, Arends MJ. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol*. 1998;185:61-70.
- 90- Field CJ, Schley PD. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:1190S-8S.
- 91- Hardman WE. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. *J. Nutr*. 2004;134:3427S-30S.
- 92- Li D, Ng A, Mann NJ, Sinclair A. Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids*. 1998;33:437-40.
- 93- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:935-45.
- 94- Hamid R, Singh J, Reddy BS, Cohen LA. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea induced rat mammary tumors. *Int. J. Oncol*. 1999;14:523-8.
- 95- Obata T, Nagakura T, Masaki T, Maekawa K, Yamashita K. Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclooxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin. Exp. Allergy*. 1999;29:1129-35.
- 96- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP et al. Cyclooxygenase-2 Expression Is Up-Regulated in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Res*. 1999 Mar;59:991-4.
- 97- Boudreau MD, Sohn KH, Rhee SH, Lee SW, Hunt JD, Hwang DH. Suppression of Tumor Cell Growth Both in Nude Mice and in Culture by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Mediation through Cyclooxygenase - independent Pathways. *Cancer Res*. 2001 Feb;61:1386-91.
- 98- Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, Kitayama W, Endoh T, Sasaki Y et al. Increased Expression of Cyclooxygenase-2 Protein in 4-Nitroquinoline-1-oxide induced Rat Tongue Carcinomas and Chemopreventive Efficacy of a Specific Inhibitor, Nimesulide. *Cancer Res*. 2001 Feb;61:1451-6.
- 99- Yamamoto K, Kitayama W, Denda A, Morisaki A, Kuniyasu H, Kirita T. Inhibitory effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors, nimesulide and etodolac, on the development of squamous cell dysplasias and carcinomas of the tongue in rats initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Letters*. 2003;199:121-9.

- 100- Yoshida K, Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Kawamori T, Mori H et al. A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and inducible nitric oxide synthase expression. *Histol Histo-pathol*. 2003;18:39-48.
- 101- Chen ZG, Zhang X, Li M, Wang Z, Wieand HS, Grandis JR et al. Simultaneously Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase and Cyclooxygenase-2, an Efficient Approach to Inhibition of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep;10:5930-9.
- 102- Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor: Pharmacologic Targets for Chemoprevention. *J Clin Oncol*. 2005;23:254-66.
- 103- Choe MS, Zhang X, Shin HJC, Shin DM, Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase 2 mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(9):1448-55.
- 104- Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1997;57:3465-70.
- 105- Dامتew B, Spagnuolo PJ. Tumor cell-endothelial cell interactions: evidence for roles for lipoxygenase products of arachidonic acid in metastasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;56:295-300.
- 106- Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(suppl):S14-9.
- 107- Yang P, Felix E, Madden T, Chan D, Newman RA. Relative formation of PGE2 and PGE3 by eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in human lung cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 2002;43:number 1533(abs.).
- 108- Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr*. 2002;132:2995-8.
- 109- Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. The role of NF-kappa-β/kappa-β proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg Oncol*. 1999;8:143-53.
- 110- Connolly JM, Rose DP. Enhanced angiogenesis and growth of 12-lipoxygenase gene transfected MCF-7 human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Lett*. 1998;132:107-12.
- 111- Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpression prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83:493-501.

- 112- Chiu LCM, Wan JMF. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett.* 1999;145:17-27.
- 113- Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2001;19:1255-62.
- 114- Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:252-66.
- 115- Dannenberg AJ, Zakim D. Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol.* 1999;26:499-504.
- 116- Sheng H, Shao J, Washington MK, Dubois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2001;276:18075-81.
- 117- Heuvel JPV. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARS) and carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 1999;47:1-8.
- 118- Fujino H, West KA, Regan JW. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem.* 2002;277:2614-19.
- 119- Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol.* 2001;2:149-56.
- 120- Jeyarajah DR, Kielar M, Penfield J, Lu CY. Docosahexaenoic acid, a component of fish oil, inhibits nitric oxide production in vitro. *J Surg Res.* 1999;83:147-50.
- 121- Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes.* 1996;45:1661-9.
- 122- Kopelovich L, Fay JR, Glazer RI, Crowell JA. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Modulators as Potential Chemopreventive Agents. *Mol Cancer Ther.* 2002 Mar;1:357-63.
- 123- Avis I, Martinez A, Tauler J, Zudaire E, Mayburd A, Abu-Ghazaleh R, Onfrey F, Mulshine JL. Inhibitors of the Arachidonic Acid Pathway and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands Have Superadditive Effects on Lung Cancer Growth Inhibition. *Cancer Res.* 2005 May;65(10):4181-90.
- 124- Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR $\gamma$ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem.* 2001 Oct;276(41):37731-4.

- 125- Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N et al. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:3951-6.
- 126- Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LG, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med.* 1998;4:1046–52.
- 127- Koeffler HP. Peroxisome Proliferator activated Receptor  $\gamma$  and Cancer. *Clinical Cancer Res.* 2003 Jan;9:1-9.
- 128- Mukherjee R, Davies PJA, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature.* (Lond.) 1997;386:407-10.
- 129- Yang W, Rachez C, Freedman LP. Discrete roles for peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8008-17.
- 130- Hamakawa H, Nakashiro K, Sumida T, Shintani S, Myers JN, Takes RP et al. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head & Neck.* 2008 Jun; Doi 10.1002:800-9.
- 131- Greenwald P. Cancer Prevention Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 2002; 20:14s-22s.
- 132- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79:1147-56.
- 133- Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, Ringel MD, Chen CS. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  signaling: the multifacets of the antitumor effect of thiazolidinedione. *Endocr-relat Cancer.* 2006;13:401-13.
- 134- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997;272:3406–10.
- 135- Suh N, Wang Y, Williams CR et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999;59:5671- 3.
- 136- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR. *Mol Cell.* 1998;1:465-70.

- 137- Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:10990–5.
- 138- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen C-J, Mueller E, Spiegelman BM et al. *PAX8-PPAR1* fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science.* 2000;289:1357–60.
- 139- Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T et al. Chemopreventive Effect of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor  $\gamma$  on Gastric Carcinogenesis in Mice. *Cancer Res.* 2005;65(11):4769–74.
- 140- Shappell SB, Gupta RA, Manning S et al. 15S-Hydroxy-eicosatetraenoic-acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001;61:497–503.
- 141- Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 1998;58:3344–52.
- 142- Yin F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:916–22.
- 143- Kato M, Kusumi T, Tsuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H. Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Onco.* 2004;130:73–9.
- 144- Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2170–7.
- 145- Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M et al. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270:400–5.
- 146- Nikitakis NG, Herbert C, Loprs MA, Reynolds MA, Sauk JJ. PPAR $\gamma$ -mediated antineoplastic effect of NSAID sulindac on human oral squamous carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2002 Jan;98:817–823.
- 147- Fukuchi K, Date M, Azuma Y et al. Apoptosis in human oral squamous cell carcinoma is induced by 5-deoxy-D 2,4-prostaglandin J2 but not by troglitazone. *J Dent Res.* 2003;82(10):802–6.



- 148- Tanaka T, Kohno H, Yoshitani S et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res.* 2001;61:2424-8.
- 149- Harris G, Ghazallah RA, Nascene D, Wuertz B, Ondrey FG. PPAR activation and decreased proliferation in oral carcinoma cells with 4-HPR. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Nov;133(5):695-701.
- 150- Kourelis K, Sotiropoulou-Bonikou G, Vandoros G, Varakis I. Peroxisome proliferator – activated receptor gamma expression correlates with the differentiation level of normal, premalignant, and malignant laryngeal squamous cells. *J Otolaryngol.* 2007 Oct;36(5):282-90.
- 151- Nakashiro K, Begum NM, Uchida D, Kawamata H, Shintani S, Sato M et al. Thiazolidinediones inhibit cell growth of human oral squamous cell carcinoma *in vitro* independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):855-61.
- 152- Nikitakis NG, Siavash H, Hebert C, Reynolds MA, Hamburger AW, Sauk JJ. 15-PGJ2, but not thiazolidinediones, inhibits cell growth, induces apoptosis, and causes downregulation of Stat3 in human oral SCCa cells. *Br J Cancer.* 2002 Sep;87:1396-403.
- 153- Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Lin DT, Subbaramaiah K. Inhibition of cyclooxygenase-2: an approach to preventing cancer of the upper aerodigestive tract. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;952:109–15.
- 154- Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem.* 1999;274:9116–21.
- 155- Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer Effects of Thiazolidinediones Are Independent of Peroxisome Proliferator-activated Receptor ? and Mediated by Inhibition of Translation Initiation. *Cancer Res.* 2001 Aug;61:6213-8.
- 156- Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor. *Diabetes.* 1999;48:254:60.
- 157- Panigrahy D, Shen LQ, Kieran MW et al. Therapeutic potential of thiazolidinediones as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003;2:925-37.
- 158- Martelli ML, Iuliano R, LePera I et al. Inhibitory effects of peroxisome poliferator activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4728-35.

- 159- Edwards IJ, O'Flaherty JT. Omega-3 Fatty Acids and PPAR? in Cancer. *PPAR Res.* 2008; Article ID 358052:14 p.
- 160- Ledwith BJ, Johnson TE, Wagner LK, Pauley CJ, Manam S, Galloway SM et al. Growth regulation by peroxisome proliferators: Opposing activities in early and late G1. *Cancer Res.* 1996;56:3257-64.
- 161- Hollingshead HE, Killins RL, Borland MG, Girroir EE, Billin AN, Willson TM et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  (PPAR  $\beta/\delta$ ) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 2007;28(12):641-9.
- 162- Terashita Y, Sasaki H, Haruki N, Nishiwaki T, Ishiguro H, Shibata Y et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2002;32(7):238-43.
- 163- Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A, Ito T, Kawamura J, Kawabe A et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2003 Oct;39(15):2239-46.
- 164- Fujii D, Yoshida K, Tanabe K, Hihara J, Toge T. The ligands of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma inhibit growth of human esophageal carcinoma cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;24(3a):1409-16.
- 165- Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, Yonemitsu K, Tomimoto A, Ikeda I et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci.* 2006 Sep;97(9):854-60.
- 166- Posch MG, Zang C, Mueller W et al. Somatic mutations in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma are rare events in human cancer cells. *Med Sci Monit.* 2004;10:BR250-254.
- 167- WHO Collaborating Centre on Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral pre-cancer. *Oral Surg.* 1978;46:18-39.
- 168- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992;166(4):375-81.
- 169- Wang GQ, Abnet CC, Shen Q et al. Histological precursors of oesophageal squamous cell carcinoma: Results from a 13 years prospective follow-up study in a high risk population. *Gut.* 2005;54:187-92.

- 170- Rubio CA, Liu FS, Zhao HZ. Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol.* 1989;13(8):685-90.
- 171- Siegel, S. *Estatística Não - Paramétrica para as Ciências do Comportamento.* McGraw-Hill;1956.
- 172- Colosimo EA, Giolo SR. *Análise de sobrevivência aplicada.* Edgard Blucher; 1996.
- 173- Kim TW, Chen Q, Shen X et al. Oral mucosal carcinogenesis in SENCAR mice. *Anticancer Res.* 2002;22:2733-40.
- 174- Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncology.* 2004;40:287-97.
- 175- Fong LY, Jiang Y, Farber JL. Zinc deficiency potentiates induction and progression of lingual and esophageal tumors in p53-deficient mice. *Carcinogenesis.* 2006;27:1489-96.
- 176- Young MR. Use of carcinogen-induced premalignant oral lesions in a dendritic cell-based vaccine to stimulate immune reactivity against both premalignant oral lesions and oral cancer. *J Immunother.* 2008;31:148-56.
- 177- Gunji A, Uemura A, Tsutsumi M et al. Parp-1 deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4 nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts. *Cancer Lett.* 2006;241:87-92.
- 178- Fernandes AO, Banerji AP. Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s). *Carcinogenesis.* 1995 Aug;16(8):1843-6.
- 179- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Elmazar MM. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *Eur J Cancer Prev.* 1999 Oct;8(5):435-40.
- 180- Kossoy G, Ben-Hur H, Elhayany A, Schneider DF, Zusman I. The morphological pathway for mouse forestomach cancer. *Oncology Reports.* 2006;15:479-83.
- 181- Okamura M, Moto M, Mugeruma M, Ito T, Jin M, Kashida Y et al. A 26-Week Carcinogenicity Study of 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-f]Quinoline in *rasH2* Mice. *Toxicol Pathol.* 2006;34:199-205.
- 182- Binato M, Krueel SM, Silveira Volkweis B, Behrend SRG, Isabel EM, Ricachenevsky GR. Mouse model of diethylnitrosamine-induced gastric cancer. *J Surg Res.* 2008 Aug;148(2):152-7.

- 183- Furihata C, Tatematsu M, Saito M, Ishida S, Nakanishi H, Inada K et al. Rare occurrence of *ras* and p53 gene mutations in mouse stomach tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res.* 1997 Apr;88(4):363-8.
- 184- Schneider P, Hinrichs S, Zulim R, Towery R, Morris C, Mirvish SS. Carcinogenesis by methylbenzyl nitrosamine near the squamocolumnar junction and methylamyl nitrosamine metabolism in the mouse forestomach. *Cancer Lett.* 1996 Apr 19;102(1-2):125-31.
- 185- Johansson SL, Hirsch JM, Larsson A, Saidi J, Osterdal BG. Snuff-induced Carcinogenesis: Effect of Snuff in Rats Initiated with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Cancer Res.* 1989 Jun;49:3063-9.
- 186- Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:532-43.
- 187- Pizato NMP. *Efeito da dieta com diferentes proporções de ácidos graxos N6:N3 sobre o crescimento tumoral, caquexia e sistema imunitário em ratos portadores de tumor de Walker 256* [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná;2005.
- 188- Simopoulos AP. The Mediterranean diets: what is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr.* 2001;131(suppl):3065S-73S.
- 189- Wen B, Deutsch E, Opolon P, Auperin A, Frascogna V, Connault E et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids decrease mucosal/epidermal reactions and enhance antitumour effect of ionising radiation with inhibition of tumour angiogenesis. *Br J Cancer.* 2003;89:1102-7.
- 190- Elattar TM, Lin HS. Comparison of the inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis I oral squamous carcinoma cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1989 Nov;38(2):119-25.
- 191- Bonatto SJR. *Avaliação da resposta imunitária em macrófagos de ratos F1, portadores de tumor de Walker 256, suplementados cronicamente com óleo de peixe* [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná;2003.
- 192- Mund RC. *Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do tumor de Walker 256: identificação de mediadores participantes neste processo* [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná;2004.
- 193- Reddy BS, Maruyama H. Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res.* 1986;46:3367-70.
- 194- Reddy BS, Sugie S. Effect of different levels of n-3 and n-6 fatty acids on azoxymethane induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.* 1988;48:6642-7.

- 195- Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in n-3 and n-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51:487-91.
- 196- Lindner MA. A fish oil diet inhibits colon cancer in mice. *Nutr Cancer.* 1991; 15:1-11.
- 197- Deschner EE, Lytle JS, Wong G, Ruperto JD, Newmark HL. The effect of dietary n-3 fatty acids (fish oil) on azoxymethanol-induced focal areas of dysplasia and colon tumor incidence. *Cancer.* 1990;66:2350-6.
- 198- Silva RA, Muñoz SE, Guzmán CA, Eynard AR. Effects of dietary n-3, n-6 and n-9 polyunsaturated fatty acids on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in C57BL6J mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995 Oct;53(4):273-7. Erratum in: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001 Jan; 64(1):74. Eynard AR [corrected to Eynard AR].
- 199- Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W et al. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology.* 2006;43:134-43.
- 200- GuoYT, Leng XS, Li T, Zhao JM, Lin XH. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23):3419-23.
- 201- Yoshida K, Hirose Y, Tanaka T, Yamada Y, Kuno T, Kohno H et al. Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Sci.* 2003 Apr; 94(4):365-71.
- 202- Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR gamma. *J Biol Chem.* 2000;275:28028-32.
- 203- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* 2001;276:12440-8.
- 204- Lefebvre A-M, Chen I, Desreumaux P et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC Min / mice. *Nat Med.* 1998;4:1053-7.
- 205- Masuda T, Wada K, Nakajima A, Okura M, Kudo C, Kadowaki T et al. Critical Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  on Anoikis and Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun;11(11):4012-21.

206- Schaefer KL, Wada K, Takahashi H et al. PPAR gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005;65:225-9.

207- Rumi MA, Sato H, Ishihara S, Ortega C, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Growth inhibition of esophageal squamous carcinoma cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *J Lab Clin Med.* 2002 Jul;140(1):17-26.

208- Takashima T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sasaki E, Tominaga K, Watanabe T et al. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and differentiation of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2005 Apr;13(4):601-6.