

## **Efeitos quimiopreventivos de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 no processo de carcinogênese do trato aerodigestivo superior induzido por 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos suíços**

**Ricardo Ribeiro Gama<sup>1</sup>, Allan Giovanini<sup>2</sup>, Fernanda Scarmato de Rosa<sup>3</sup>, Daniel Cury Ogata<sup>4</sup>, André Luiz Vettore de Oliveira<sup>5</sup>, Ana Flávia Cardoso Costa<sup>6</sup>, Carolina Talini<sup>6</sup>, Denise Feniman<sup>6</sup>, Douglas Kamei<sup>6</sup>, Celso Felipe Júnior<sup>6</sup>, Allan Coco<sup>6</sup>, André Lopes Carvalho<sup>1,7</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Oral, Odontologia, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Farmácia e Bioquímica, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, SP, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Pesquisa, Patologia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>6</sup> Laboratório de Técnicas Operatórias e Cirurgia Experimental, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>7</sup> Departamento de Oncologia da Cabeça e do Pescoço, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brasil

\* A correspondência deve ser endereçada a: Ricardo Ribeiro Gama.

e-mail: [ricardorgama@yahoo.com.br](mailto:ricardorgama@yahoo.com.br)

Alameda Augusto Stelfeld, 2134 – Curitiba - Paraná – Brasil

CEP: 80730150

Telefone: 554196319393

## RESUMO

**Objetivo:** Estudar os potenciais efeitos quimiopreventivos de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em camundongos suíços submetidos a indução carcinogênica oral e esofágica por 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO). **Desenho do estudo:** Os animais passaram por indução carcinogênica com 50 µg/ml de 4-NQO por 8 semanas. Os animais foram divididos em grupos: Grupo I – indução com 4-NQO sem quimioprevenção; Grupo II - quimioprevenção com acréscimo de 5% de óleo de peixe na dieta após indução carcinogênica com 4-NQO e Grupo III - quimioprevenção com 5% de óleo de peixe na dieta durante e após a indução carcinogênica com 4-NQO. **Resultados:** A incidência do carcinoma oral invasivo foi de: Grupo I (72,9%); Grupo II (84,2%) e Grupo III (64,7%);  $p=0,34$ . A diferença na incidência de carcinoma esofágico invasivo foi estatisticamente significativa: Grupo I (37,8%), Grupo II (68,4%) e Grupo III (29,4%);  $p=0,02$ . **Conclusões:** A indução com 4-NQO levou ao câncer na maioria dos animais. A quimioprevenção com óleo de peixe não trouxe benefícios na prevenção do processo carcinogênico iniciado pelo 4-NQO no câncer oral. A ação pró-tumor sugestiva do óleo de peixe quando administrado após o início do tumor parece demonstrar que este ácido graxo pode potencializar a ação do 4-NQO na carcinogênese esofágica dos camundongos suíços.

**Palavras-chave:** Câncer de Cabeça e Pescoço; Carcinoma de Células Escamosas; 4-NQO; Carcinogênese; Quimioprevenção; Ácidos Graxos Insaturados.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (HNSCC) é a quinta neoplasia mais frequente no mundo<sup>1</sup>. Nos Estados Unidos, é responsável por 3,3% de todas as malignidades. A American Cancer Society estimou para 2013 aproximadamente 53640 novos casos de câncer do trato aerodigestivo superior (UADT) - câncer na cavidade oral, faringe e laringe - que resultaram em 11520 mortes<sup>2</sup> aproximadamente. Em 2009, a estimativa era de 500000 novos casos de HNSCC em todo o mundo<sup>1</sup>.

Apesar dos avanços na terapêutica de HNSCC, o diagnóstico ainda é feito com bastante frequência em um estágio clínico avançado. Além disso, os pacientes foram expostos aos principais fatores de risco (tabaco e álcool) por um longo tempo, assim o risco de desenvolver um segundo tumor primário pode atingir até 3% a 7% por ano nesses pacientes<sup>3</sup>. O segundo primário do trato aerodigestivo superior é considerado a principal causa de morte por câncer entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço em estágio inicial que foram tratados adequadamente no passado e tiveram acompanhamento de longo prazo<sup>4</sup>.

Assim como ocorre com muitos outros tumores epiteliais, o HNSCC deriva do acúmulo de muitas alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em múltiplos eventos sequenciais<sup>5</sup>. A observação de uma determinada frequência de segundos tumores primários após câncer da cavidade oral levaram Slaughter et al.<sup>6</sup> a propor a teoria da “*cancerização de campo*”. Esta teoria sugere que os múltiplos tumores primários individuais podem surgir independentemente no UADT como resultado de anos de exposição crônica a carcinógenos. Por isso, é importante não só tratar o HNSCC adequadamente em sua primeira apresentação clínica, mas também estudar estratégias quimiopreventivas para que os segundos tumores primários sejam prevenidos, já que contribuem para um maior declínio na sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço no UADT<sup>4,7</sup>.

Conforme definido por Sporn et al.<sup>8</sup>, o termo quimioprevenção denota o uso de um agente químico natural ou sintético com o objetivo de reverter, retardar ou suprimir a progressão da carcinogênese para câncer invasivo, ou prevenir o desenvolvimento de lesões pré-malignas.. A quimioprevenção pode ser feita durante a fase inicial, que inibe o desenvolvimento de câncer invasivo bloqueando a lesão no DNA, ou pode ser feita durante as fases de promoção ou progressão que levam à reversão ou supressão da progressão de células pré-malignas, onde a lesão no DNA já ocorreu<sup>9</sup>.

O composto nitroso de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) é um derivado de quinolina solúvel em água que leva a adutos na molécula de DNA já que se liga aos locais de guanina<sup>10</sup> e induz a produção de espécies reativas a oxigênio, resultando em mutações e quebras na fita de DNA<sup>11,12</sup> – todas as alterações genéticas são semelhantes àquelas causadas por carcinógenos de tabaco<sup>13,14,15</sup>. O efeito carcinogênico do 4-NQO foi observado pela primeira vez por Nakahara et al.<sup>16</sup>. Esta substância mostrou-se eficaz na indução de carcinoma de células escamosas (SCC) da cavidade oral e do esôfago em animais de laboratório, tais como camundongos<sup>17,18,19</sup>. Tal indução produz um modelo de carcinogênese temporal que produz múltiplas lesões preneoplásticas, displásticas e neoplásticas no mesmo animal após um certo período de exposição química<sup>20</sup>. Além disso, não desencadeia uma reação inflamatória local e leva ao desenvolvimento de um amplo

espectro de lesões histopatologicamente muito semelhantes às aquelas vistas em carcinogênese de UADT em humanos<sup>21,22</sup>. Mesmo depois de cessada a exposição à substância química, o processo carcinogênico continua, com as primeiras lesões preneoplásticas surgindo semanas após a exposição ao 4-NQO<sup>7,22</sup>.

Tang et al.<sup>22</sup> demonstrou que a diluição do 4-NQO em animais que bebem água é menos laboriosa e superior na indução carcinogênica quando comparado à exposição tópica tradicional, e é suficiente para causar lesões pré-malignas e carcinoma invasivo de células escamosas da cavidade oral e do esôfago em camundongos geneticamente modificados. Quanto mais alta a dose e mais longo o período de exposição à substância na água, mais rápido, mais eficaz e mais letal o processo de carcinogênese de UADT nos animais.

As gorduras saturadas estão implicadas na etiologia de vários tipos de tumores. Contudo, a evidência da ação antitumoral de PUFAS ômega-3, tais como ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) é extensivamente apresentada na literatura de pesquisa<sup>23, 24, 25</sup>. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) são ácidos graxos essenciais obtidos da dieta e subdivididos em derivados de ácido linoleico (ômega-6) e ácido  $\alpha$ -linoleico (ômega-3). São componentes-chave dos fosfolipídios da membrana celular e substratos para várias enzimas<sup>26</sup>.

Os PUFAS ômega-6 podem ser consumidos principalmente como ácido linoleico encontrado em óleos vegetais ou como ácido araquidônico (AA) obtido das carnes<sup>27</sup>. Os PUFAS ômega-3 são consumidos como ácido  $\alpha$ -linolenico e são encontrados em concentrações variadas em alguns óleos, como óleo de canola e em vegetais de folhas escuras<sup>26</sup>. PUFAS de cadeia longa, especialmente EPA e DHA, são encontrados em peixes de água fria e em óleos de peixe (FO)<sup>26</sup>.

Uma das funções mais importantes dos PUFAS está relacionada à sua conversão enzimática em eicosanoides, que são lipídios com ação parecida com a hormonal<sup>28</sup>. Os eicosanoides modulam respostas tanto inflamatórias quanto imunológicas, agregação de plaquetas, crescimento celular e diferenciação celular<sup>28</sup>. A produção de eicosanoides a partir dos PUFAS depende da ação de ciclo-oxigenases (COX) e lipo-oxigenases (LOX). As ciclo-oxigenases, agindo em AA e EPA, originam prostaglandinas e tromboxanos, enquanto que as lipo-oxigenases, que agem nos mesmos substratos, fazem surgir leucotrienos e lipoxinas<sup>26, 28</sup>. As prostaglandinas e tromboxanos de 2 séries e leucotrienos de 4 séries, derivados de AA, tendem a ser mais pró-inflamatória e pró-proliferativa na maioria dos tecidos, enquanto que as prostaglandinas e tromboxanos de 3 séries e leucotrienos de 5 séries derivados de EPA são menos contribuintes da inflamação e da proliferação<sup>26,28</sup>. Por isso, os eicosanoides derivados de EPA são menos favoráveis ao crescimento de células tumorais<sup>26</sup> e quando o EPA/DHA estão presentes e disponíveis, serão usados preferencialmente por COX e LOX<sup>26,28</sup>. Em suma, o suposto mecanismo principal por meio do qual o PUFAS ômega-3 reduz o

risco de câncer leva à supressão da biossíntese pró-proliferativa de eicosanoides derivados de AA<sup>26,28</sup>.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do PUFAS ômega-3 ou de óleo de peixe (FO) como potencial agente quimiopreventivo para prevenir a carcinogênese de UADT iniciado por 4-NQO em camundongos suíços.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todo o trabalho experimental foi aprovado previamente pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade Evangélica do Paraná e da Universidade de São Paulo, e atenderam às diretrizes de tratamento e cuidados com animais estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais do estudo foram camundongos suíços albinos (*Mus musculus*) com idade entre 6 e 9 semanas, com proporção igual de machos e fêmeas nos diferentes grupos. Foram criados em ambiente adequado com ciclo controlado de luz-escurecimento (12-14 h/dia), temperatura (20–23<sup>o</sup>C) e umidade do ar (40%–60%). Água e comida foram dados *ad libitum*. A comida isocalórica padrão para os camundongos foi fornecida para todos os grupos: Nuvilab CR-1<sup>®</sup> (Nuvital, Brasil).

O carcinógeno 4-NQO (Sigma-Aldrich, EUA) foi homogeneizado semanalmente em propilenoglicol a uma concentração final de 5 mg/ml. A solução resultante foi armazenada em refrigerador a 4°C no Laboratório de Bioquímica da Faculdade Evangélica do Paraná. Esta solução foi então diluída na água potável dos camundongos a uma concentração final de 50 µg/ml e alterada a cada 48 a 72 h por oito semanas. Como o 4-NQO é sensível à luz, os frascos foram envolvidos em papel alumínio para protegê-los adequadamente da luz no ambiente de criação dos camundongos.

O ômega-3 foi preparado a uma concentração de 5% misturada na comida triturada por um farmacêutico. As cápsulas de 1 g de ômega-3 continham 12,5% de ácido docosahexaenoico (DHA – 125 mg); 17,5% ácido eicosapentaenoico (EPA – 175 mg) e 10 mg de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). O alimento foi preparado semanalmente no Laboratório de Bioquímica da Faculdade Evangélica do Paraná e armazenado no refrigerador com temperatura entre 1,7°C a 3°C. A receita foi criada pelo Laboratório de Farmácia e Bioquímica do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos e sua estabilidade no refrigerador e na temperatura do ambiente de criação, além da eficácia do óleo de peixe misturado com os agentes aglutinadores, foram testadas e aprovadas antes de administradas nos animais. A mistura de PUFA ômega-3 em uma dieta regular foi feita nas seguintes etapas:

a) 25 g de amido de milho foram misturados em 225 ml de água. Os ingredientes foram misturados enquanto eram aquecidos até a obtenção de um produto consistente (*goma*);

b) 300 g de farelo (triturado) foram misturados com 15 cápsulas de ômega-3 (1 g cada) e 0,7g de Mix<sup>®</sup> anti-mofo (2,5%) – concentração final de 5% de óleo de peixe;

c) Em uma tigela grande os 300 g de farelo + 5% ômega-3 + anti-mofo foram misturados manualmente com os agentes aglutinadores: 40 g de *goma* e com 110 g de gelatina (Mix<sup>®</sup>);

d) O produto final era sólido e cabia perfeitamente em uma bandeja plástica com espaços redondos vazios, que eram então comprimidos digitalmente e deixados secar por 2 horas. Por fim, foram tirados dos moldes e dados aos animais que podiam roê-los. A comida era repostada todos os dias no ambiente de criação dos animais.

### **Grupos de estudo**

Os animais foram divididos em:

- a) **Grupo 0 – controle (10 animais)**: receberam somente água e comida (*monitor do ambiente de criação*);
- b) **Grupo I – 4-NQO 50 (43 animais)**: receberam 50 µg/ml de 4-NQO por oito semanas e nenhuma quimioprevenção. O grupo foi acompanhado por mais 24 semanas;
- c) **Grupo II – 4-NQO 50 → FO 5% (20 animais)**: receberam 50 µg/ml de 4-NQO por oito semanas. Uma semana após a conclusão da indução do tumor, este grupo recebeu quimioprevenção com óleo de peixe (acréscimo de 5% na dieta) por 24 semanas;
- d) **Grupo III – 4-NQO 50 + FO 5% → FO 5% (18 animais)**: receberam 50 µg/ml de 4-NQO por oito semanas em simultâneo com a quimioprevenção com óleo de peixe (acréscimo de 5% na dieta). Depois de concluída a indução do tumor, a quimioprevenção foi mantida por outras 24 semanas;
- e) **Grupo IV – FO 5% (5 animais)**: receberam um acréscimo de 5% de óleo de peixe na dieta por 24 semanas;
- f) **Grupo V – propilenoglicol (10 animais)**: receberam apenas veículo (**propilenoglicol**) por oito semanas e foram acompanhados por outras 24 semanas.

[Figura 1]

### **Necropsia e estudo histológico**

O estudo foi concluído 34 semanas após o início.

Os animais foram sacrificados em uma câmara de CO<sub>2</sub> no final do estudo ou quando mostraram sinais de caquexia, letargia ou agonia pela progressão do tumor. Em um desses momentos, os animais foram necropsiados e os órgãos de interesse foram removidos no Laboratório de Técnicas Operatórias e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica do Paraná, depois foram fotografados e encaminhados aos Laboratórios de Patologia. As amostras de cavidade oral foram enviadas adequadamente fixas e imersas em formalina a 10% à noite, depois analisadas por um patologista oral experiente no Laboratório de Patologia Oral no departamento de Odontologia da Universidade Positivo. As amostras esofágicas foram enviadas adequadamente abertas, fixas e imersas em formalina a 10% à noite, depois analisadas por outro patologista digestivo experiente no Laboratório de Pesquisa no departamento de Patologia da Universidade do Vale do Itajaí. A descrição macroscópica das lesões foi feita e registrada pelos patologistas. As seções cruzadas dos tecidos e tumores foram preparadas e, depois disso, embebidas em parafina e seccionadas em partes de 5-µm. As seções das línguas e dos esôfagos foram desparafinizadas, reidratadas e marcadas com H&E para histopatologia.

As lesões de cavidade oral foram classificadas como (1) hiperplasia epitelial e hiperqueratose, (2) displasia leve a moderada, (3) carcinoma *in situ*, (4) carcinoma verrucoso, (5) SCC invasivo<sup>29,30</sup>.

As lesões esofágicas foram classificadas como (1) hiperplasia epitelial e hiperqueratose, (2) displasia de baixo grau, (3) displasia de alto grau, (4) carcinoma *in situ*, (5) carcinoma verrucoso, (6) SCC invasivo<sup>31,32</sup>.

A hiperplasia foi definida como epitélio espesso com queratinização proeminente de superfície, com ou sem cristas interpapilares alongadas. A displasia foi definida como perda de polaridade nas células epiteliais, pleomorfismo nuclear e hiperchromasia, queratinização anormal de célula única (disqueratose) e mitoses aumentadas ou anormais. As lesões com essas alterações envolvendo toda a espessura do epitélio foram consideradas carcinoma *in situ*. O carcinoma verrucoso foi definido como crescimento exofítico não invasivo de células neoplásticas (aspecto verrucoso), e o carcinoma invasivo de células escamosas foi definido como lesão com invasão nos tecidos subepiteliais<sup>22,32</sup>.

### **Análise estatística**

Para a análise estatística, foi usado o software SPSS 18.0. O teste qui-quadrado ou exato de Fisher foi usado para avaliar as diferenças nas taxas de incidência das lesões tumorais encontradas nos diferentes grupos do estudo. Para a análise de sobrevida, o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier foi usado, enquanto que o teste de classificação logarítmica foi usado para comparar curvas de sobrevida. Para todos os testes estatísticos, os valores p mais baixos que 0,05 (5%) foram considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

### **Incidência de carcinomas invasivos oral e esofágico e os efeitos da quimioprevenção**

Seis animais do grupo I, um do grupo II e um do grupo III morreram precocemente (antes de 20 semanas após a conclusão da indução do tumor) e foram excluídos da análise estatística de incidência de neoplasia invasiva. O fato de que esta exclusão foi feita com base na literatura sobre o assunto, que estabeleceu 20 semanas como período mínimo de tempo para que o carcinoma invasivo de célula escamosa pode ser detectado no UADT<sup>22</sup>.

De todos os animais analisados expostos à ação do 4-NQO, 90,5% desenvolveram neoplasia invasiva em pelo menos um órgão do UADT. Os 9,5% restantes não desenvolveram; entretanto, já apresentaram lesões pré-neoplásticas. A taxa de incidência de carcinoma oral no grupo I foi de 72,9%, e 37,8% foi a taxa para carcinoma esofágico. Se o mesmo animal tinha lesões pré-malignas e malignas no mesmo órgão, somente as malignas (invasivas) foram computadas.

No final do período, quando todos os animais foram submetidos à eutanásia, a incidência de neoplasia oral foi de 72,9% no grupo I, 84,2% no grupo II e 64,7% no grupo III. As comparações intergrupos não resultaram em diferença estatisticamente significativa na incidência de neoplasia invasiva da cavidade oral ( $p = 0,34$ ) [Tabela 1].

Quanto às neoplasias esofágicas induzidas, observamos uma taxa de incidência mais alta de carcinomas invasivos esofágicos no grupo II (68,4%) quando comparado ao grupo I (37,8%);  $p=0,015$ . Também foi observado ao comparar o grupo II com o grupo III (29,4%);  $p= 0,021$ . Não houve diferença estatística entre os grupos I e III ( $p=0,71$ ) [Tabela 2].

### **Análise de sobrevida**



Nas semanas que se seguiram à conclusão da indução do tumor, houve perda considerável de animais como resultado do curso natural do processo de carcinogênese, bem como de outras causas, como broncopneumonia, ação do 4-NQO / óleo de peixe e causas indeterminadas. Durante o período de observação no grupo I, cinco animais morreram devido ao câncer e nove animais devido a outras causas, tais como infecção, lesão de tecido ou falha orgânica causada pela ação do 4-NQO. Durante o período de quimioprevenção, seis animais morreram devido ao câncer e três devido a outras causas no grupo II, enquanto que no grupo III houve duas e quatro mortes, respectivamente. A tabela 3 mostra o número de animais em cada grupo que morreram ou que foram submetidos à eutanásia devido ao câncer ou a outras causas no período de 24 semanas após a indução de tumor pelo 4-NQO.

Dentre os 50 grupos de 4-NQO que receberam ou não a quimioprevenção, não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade: entre os grupos I e II ( $p=0,07$ ), entre os grupos I e III ( $p=1,00$ ) e entre os grupos II e III ( $p=0,23$ ).

A análise da sobrevida geral nas 24 semanas após o período de indução do tumor com 4-NQO a 50  $\mu\text{g/ml}$ , seguido ou não por quimioprevenção com óleo de peixe em diferentes fases da carcinogênese, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,74$ ) (Figura 2).

## **DISCUSSÃO**

No presente estudo, a carcinogênese de UADT induzida quimicamente foi obtida com êxito em camundongos suíços por meio de 4-NQO diluído na água potável ingerida pelos camundongos durante 8 semanas.

Embora haja relatos sobre o uso de outros agentes carcinogênicos, como benzopireno, nestes animais<sup>33, 34</sup>, não há nenhum relato na literatura sobre a indução de carcinogênese de UADT em camundongos suíços após a exposição ao 4-NQO. Os grupos I, II e III de animais foram observados durante outras 24 semanas, totalizando 32 a 34 semanas de duração do experimento por grupo. Como resultado, uma taxa de incidência de 72,9% de neoplasia oral foi encontrada no grupo I, enquanto que a taxa de carcinoma esofágico foi de 37,8%. Além disso, muitos animais desenvolveram uma associação de neoplasmas invasivos em mais de um órgão. Isso aumenta a incidência de neoplasmas por grupo. Por isso, no grupo I, os autores encontraram pelo menos um carcinoma invasivo de UADT em 83,7% dos animais.

A exclusão de 8 animais que morreram precocemente no estudo, considerando-se a observação de que a grande maioria dos animais deste estudo mostraram lesões invasivas após 20 semanas, não deve afetar os resultados observados. Assim sendo, existe baixa probabilidade de

subestimar a indução tumoral considerando-se as mortes prematuras de outras causas que não sejam relacionadas ao tumor, já que a duração de tempo pode não ter sido suficiente para o desenvolvimento de lesões invasivas no grupo I<sup>22</sup>. Além disso, nos grupos com quimioprevenção, a possibilidade de superestimar está excluída ao minimizar a chance de concluir erroneamente que os animais foram protegidos do câncer pela eficácia da quimioprevenção quando, na verdade, não desenvolveram-no porque faleceram ou foram sacrificados precocemente, antes que a carcinogênese atingisse o estágio invasivo.

Tang et al.<sup>22</sup> administraram 4-NQO na água de CBA e C57BL/6 camundongos por 8 ou 16 semanas em concentrações de 20, 50 e 100 µg/ml e observaram os animais por mais 16 e 8 semanas, respectivamente (duração total do experimento - 22 a 24 semanas). Houve 100% de incidência de carcinoma de célula escamosa na língua, 16 semanas após a conclusão da indução do tumor nos camundongos expostos por oito semanas a 50 µg/ml de 4-NQO. Foi encontrada uma taxa mais baixa de neoplasia esofágica (33%).

Ao comparar os dois estudos, observa-se que, embora a incidência de neoplasia esofágica seja maior neste estudo, a incidência de neoplasia oral não é maior. O motivo dessa diferença não está esclarecido, já que os animais neste estudo foram observados por um período maior e sabe-se que quanto maior o período de observação, maior a incidência de neoplasmas invasivos observados no final do experimento. Um dos motivos pode ser as diferentes estirpes de animais usados, já que os camundongos usados no estudo por Tang et al.<sup>22</sup> foram geneticamente manipulados para expressar versões modificadas de genes relevantes que podem facilitar a ação do 4-NQO no estágio inicial, e até acelerar o processo de carcinogênese em razão de uma lesão genética anterior (área suscetível) associada à exposição a um agente carcinogênico.

A adição do PUFAS ômega-3 à dieta induz mecanismos de pró-diferenciação, antiproliferação e pró-apoptótico em vários tipos de câncer estudados<sup>28</sup>. Entretanto, estudos epidemiológicos que buscam correlacionar a ingestão de PUFAS ômega-3 e o risco de câncer em humanos não são conclusivos<sup>35</sup>. Aproximadamente metade dos estudos que tentam correlacionar o aumento na ingestão de PUFAS ômega-3 com um risco mais baixo de câncer falharam em demonstrar essa associação<sup>28</sup>. Uma das explicações plausíveis para este achado negativo é que a população que usou o PUFAS ômega-3 o fez em doses muito pequenas para produzir qualquer efeito protetor<sup>28</sup>, em oposição aos estudos conduzidos com animais, nos quais doses muito altas levaram a resultados positivos descritos na literatura sobre o assunto<sup>36</sup>.

Não há consenso sobre a dose antitumoral de PUFAS ômega-3. Os estudos mencionam uma adição de 10%, 20% ou até 30% de óleo de peixe na dieta de laboratório dos animais, com

resultados positivos no controle da caquexia, na estimulação do sistema imunológico e até na inibição do crescimento do tumor em algumas linhas celulares neoplásticas<sup>36</sup>. Tais doses, se administradas em humanos, são muito maiores do que as doses usadas convencionalmente para um efeito hipolipêmico. A viabilidade do uso em humanos exigiria a execução de testes.

No presente estudo, o óleo de peixe não foi útil na detenção do processo carcinogênico iniciado pelo 4-NQO. Tanto a taxa de incidência de neoplasia oral quanto de neoplasia esofágica invasiva foram maiores no grupo II. Com relação ao esôfago, este fato é corroborado pela diferença estatística significativa na comparação com outros grupos. A literatura descreve uma ação antitumoral de um dado agente em um órgão ou tecido e a possível ação pró-tumor do mesmo agente em outro órgão ou tecido, conforme observado em Mayne et al<sup>37</sup> com betacaroteno, que se mostrou promissor na quimioprevenção de HNSCC, embora tenha revelado um potencial efeito pró-tumor no trato respiratório e nos pulmões de fumantes. Baseado em nossos resultados, acreditamos que o uso de óleo de peixe após o início (grupo II) pode ter, de alguma forma, potencializado a carcinogênese esofágica iniciada pela ação do 4-NQO.

## **CONCLUSÕES**

O modelo de carcinogênese em UADT induzido por 4-NQO em camundongos suíços é eficaz. Entretanto, com base na metodologia empregada neste estudo e nos resultados obtidos, o uso de diferentes formas de quimioprevenção com PUFAS ômega-3 (óleo de peixe) não foi benéfico na prevenção, no retardo ou na supressão da carcinogênese do UADT induzido por 4-NQO.

Curiosamente, a ação pró-tumor sugestiva do óleo de peixe quando administrado após o início do tumor parece demonstrar que este ácido graxo pode potencializar a ação do 4-NQO na carcinogênese esofágica dos camundongos suíços. Este achado requer mais pesquisa e validação por outros estudos.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem os bioquímicos no laboratório de manipulação Cosmética, em Curitiba, pelo fornecimento das cápsulas de óleo de peixe; Dr. Maria Fernanda Torres, responsável

pela colônia de criação da Universidade Positivo de Curitiba, por fornecer os camundongos suíços, e Flaviane Peccin, pelo conselho estatístico. A. L. V. possui bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (302360/2008-5). A. L. C. possui bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (313181/2009-8).

*Conflitos de interesse: nada a declarar*

## Referências

- 1- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) **Global cancer statistics 2002**. *CA Cancer J Clin* **55**:74-108.
- 2- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) **Cancer statistics, 2013**. *CA Cancer J Clin* **63** (1): 11-30.
- 3- Day GL, Blot WJ (1992) **Second primary tumors in patients with oral cancer**. *Cancer* **70**: 14-19.
- 4- Lippman SM, HongWK (1989) **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* **17**: 691-694.
- 5- Forastiere A., Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) **Head and neck cancer**. *N Engl J Med* **345**: 1890-1900.
- 6- Slaughter DP, Southwick HW, Smejka W(1953) **Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin**. *Cancer* **6**: 963-968.
- 7- Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW (2009) **ABT-510 Is an Effective Chemopreventive Agent in the Mouse 4-Nitroquinoline 1-Oxide Model of Oral Carcinogenesis**. *Cancer Prev Res* **2**(4): 385-393.
- 8- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, et al (1976) **Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)**. *Fed Proc* **35**: 1332-1338.
- 9- Hong WK, Sporn MB (1997) **Recent Advances in Chemoprevention of Cancer**. *Science* **278**: 1073-1077.
- 10- Venkat JA, Shami S, Davis K, Nayak M, Plimmer JR, Pfeil R, et al. (1995) **Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by a modified SOS microplate assay**. *Environ. Mol. Mutagen* **25**: 67-76.
- 11- Nunoshiba T, Demple B (1993) **Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide**. *Cancer Res* **53**: 3250-3252.
- 12- Miao ZH, Rao A, Agama K, Antony S, Kohn KW, Pommier Y (2006) **4-Nitroquinoline-1-Oxide Induces the Formation of Cellular Topoisomerase I-DNA Cleavage Complexes**. *Cancer Res* **66**(13): 6540-6545.

- 13- Kanojia D, Vaidya MM (2006) **4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis.** *Oral Oncology* **42**: 655-667.
- 14- Ramotar D, Belanger E, Brodeur I, Masson JY, Dro-Betsky EA (1998) **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* **273**: 21489-21496.
- 15- Kim MM, Glazer CA, Mambo E, Chatterjee A, Zhao M, Sidransky D, et al. (2006) **Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO.** *Oral Oncol* **42**: 201-207.
- 16- Nakahara W, Fukuoka F, Sugimura T (1957) **Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide.** *Gann* **48**: 129.
- 17- Steidler NE, Reade RC (1986) **Initiation and promotion of experimental oral mucosa carcinogenesis in mice.** *J Oral Pathol* **15**: 43-47.
- 18- Yuan B, Heniford BW, Ackermann DM, Hawkins BL, Hendier FJ (1994) **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* **54**: 5310-5317.
- 19- Hawkins BL, Heniford B, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ (1994) **4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma.** *Head Neck* **16**: 424-432.
- 20- Vered M, Yarom N, Dayan D (2005) **4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations.** *Oral Oncology* **41**: 337-339.
- 21- Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A (1996) **Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the wistar rat palatal mucosa: 4-NQO model.** *Head & Neck* **18**: 441-449.
- 22- Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ (2004) **Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice.** *Clinical Cancer R* **10**: 301-313.
- 23- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999) **Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers.** *Carcinogenesis* **20**: 2209-2218.
- 24- Rose DP, Connolly JM (1999) **Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents.** *Pharmacol Ther* **83**: 217-244.
- 25- Hardman WE (2002) **Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy.** *J Nutr* **132**: 3508S-3512S.
- 26- Hardman WE (2004) **(n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy.** *J Nutr* **134**: 3427S-3430S.

- 27- Li D Ng A, Mann NJ, Sinclair A (1998) **Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid.** *Lipids* **33**: 437-440.
- 28- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A (2004) **Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms.** *Am J Clin Nutr* **79**: 935-945.
- 29- WHO Collaborating Centre on Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral pre-cancer (1978) *Oral Surg* **46**: 518-539.
- 30- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A (1992) **Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value.** *J Pathol* **166**(4): 375-381.
- 31- Wang GQ, Abnet CC, Shen Q, Lewin KJ, Sun XD, Roth MJ, et al (2005) **Histological precursors of oesophageal squamous cell carcinoma: results from a 13 year prospective follow up study in a high risk population.** *Gut* **54**: 187-192.
- 32- Rubio CA, Liu FS, Zhao HZ (1989) **Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus.** *Am J Surg Pathol* **13**: 685-690.
- 33- Fernandes AO, Banerji AP (1995) **Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s).** *Carcinogenesis* **16**(8): 1843-1846.
- 34- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Elmazar MM (1999) **Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone.** *Eur J Cancer Prev* **8**(5): 435-440.
- 35- Terry PD, Rohan TE, Wolk A (2003) **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* **77**: 532-543.
- 36- Pizato NMP (2005) **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 de doutorado*. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia.
- 37- Mayne ST Cartmel B, Baum M, Short-Posner G, Fallon BG, Briskin K, et al (2001) **Randomized trial of supplemental beta-carotene to prevent second head and neck cancer.** *Cancer Research* **61**: 1457-1463.