

# Tumor de Ehrlich na língua de camundongo, simulando o câncer oral humano com metástase cervical oculta e clínica: um modelo experimental translacional em animais imunocompetentes

*Ehrlich's tumor in the tongue of mouse, mimetizing the human oral cancer with clincical and occult cervical metastasis: a experimental translacional model in immunocompetent animals*

Claudio Cavalcanti <sup>1</sup>  
 Fernando Antônio Gomes de Andrade <sup>2</sup>  
 Antenor Teixeira <sup>3</sup>  
 Ricardo Bentes de Azevedo <sup>4</sup>

## RESUMO

**Introdução:** O conhecimento do comportamento biológico do tumor no seu micro ambiente e a sua disseminação é fundamental para entender a progressão e o prognóstico do câncer . A medicina translacional busca no laboratório o conhecimento para tratar o homem. **Objetivo:** Apresentar um modelo animal imunocompetente com tumor de Ehrlich que mimetize o câncer oral inicial e a metástase cervical. **Material e Métodos:** Foram estudados 20 camundongos Swiss divididos em quatro grupos iguais . No controle, grupo I, com PBS simulou a técnica de indução. Os grupos II, III e IV, foram induzidos na língua com 1,25 x 10<sup>6</sup> células de Ehrlich em 10µl de solução. Em 48h o grupo III foi eutanasiado e realizado a pesquisa de metástase cervical com anticorpos monoclonais AE1/AE3. No mesmo tempo no grupo IV, os tumores da língua foram retirados, e os animais viveram por 45 dias. **Resultados:** No grupo I todos os animais vivos sem alteração do estado de saúde. Nos grupos restantes todos tiveram tumor. O grupo II todos sacrificados com sete dias com tumor extenso. No grupo III a imunohistoquímica com AE1/AE3 foi 100% positiva para metástases ocultas em linfonodos cervicais. No grupo IV, não houve nenhuma recidiva do tumor local e um animal (20%) desenvolveu metástase cervical com 45 dias. **Conclusão:** trata-se de modelo animal imunocompetente eficiente para as pesquisas do microambiente tumoral. Observou-se tumor local e metástase cervical precoce e tardia, simulando a epidemiologia dos tumores iniciais de língua.

**Descritores:** Neoplasias; Nódulos Linfáticos Agregados; Experimentação Animal.

## ABSTRACT

**Introduction:** Knowledge of biological behavior of the tumor microenvironment and dissemination is fundamental to understand oral cancer progression and prognosis. Immunocompetent animals with active immunological system enable us to better study tongue's epithelial tumor and regional metastasis. **Objective:** To develop a rapid animal model for epithelial tongue cancer and cervical lymph node metastasis in immunocompetent swiss mice with epithelial Ehrlich cells. **Material and Methods:** It was studied 20 animals, divided in 4 groups with 5 mice. Group I as control with PBS, and groups II, III, IV for tumor induction. Cell suspensions were collected from peritoneal fluids of mice and 10µl (1,25 x 10<sup>6</sup> cells) was injected directed into the mice's submucosa tongue. It was started the sacrifice from 48h after induction. Examination was made from clinical view, pathological macroscopic and microscope with hematoxylin-eosin (H-E) and human monoclonal antibody immunohistochemistry stain and AE1/AE3. **Results:** Tongues tumors were developed clinically since 48h from tumor induction and lymph nodes cervical occult metastasis was detected by AE1/AE3 monoclonal antibody at that time in whole group, and by H-E in the seventh day. **Conclusion:** We believe this model presents a rapid development of epithelial Ehrlich tumor in the tongue of immunocompetent swiss mice, mimetizing microenvironment of the oral squamous cell carcinoma (oscc), with local tumor infiltration and early cervical lymph node dissemination, resembling oscc in human.

**Key words:** Tongue Neoplasms; Lymphatic Metastasis; Animal Experimentation; Translational Medical Research.

## INTRODUÇÃO

Independente dos recentes avanços na terapia com cirurgia, radioterapia, e farmacoterapia, a taxa de mortalidade do câncer de Cabeça e Pescoço não tem melhorado nos últimos 30 anos, e a sobrevida em 5

anos permanece a mesma e é a mais baixa de todos os cânceres<sup>1,2,3,4</sup>. A maior parte da falha do tratamento é devido a presença de metástase locoregional no momento do diagnóstico e após o tratamento<sup>2</sup>.

A presença de metástase para linfonodos cervicais em cabeça e pescoço é o preditor mais importante

1) Pós-Doutor em Nanobiotecnologia (no tratamento do câncer de boca e da pele), UnB (professor adjunto da da Faculdade de Medicina UFAL).

2) Doutor em Cirurgia Plástica, Escola Paulista de Medicina. Professor adjunto da Faculdade de Medicina da UFAL.

3) Professor Assistente de Patologia da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas, UNCISAL. Patologista da Santa Casa de Maceió.

4) Professor Titular do Departamento de Biologia, Laboratório de Nanobiotecnologia, UnB. Professor e Pesquisador do Departamento de Biologia, Laboratório de Nanobiotecnologia, UnB.

Instituição: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, (ICC-UnB), laboratório de nanotecnologia/ Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Correspondência: Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, (ICC-UnB), Laboratório de Nanotecnologia - Campus Darcy Ribeiro, Brasília / DF - Brasil - Telefone: (+55 61) 8489-3404- E-mail: cclaudiocavalcanti@hotmail.com

INCT em Nanobiotecnologia, CNPq e FAPEDF

Artigo recebido em 12/07/2015; aceito para publicação em 27/10/2015; publicado online em 18/12/2015.

Conflito de interesse: não há. Fonte de fomento: INCT em Nanobiotecnologia, CNPq e FAPEDF

individualmente para um pior prognóstico<sup>3,4</sup>. A rota inicial de disseminação dos tumores epiteliais em cabeça e pescoço é por via linfática e a sobrevida em 5 anos dos pacientes que apresentam metástases diminuem em 50% em relação a dos pacientes que não apresentam metástases<sup>2,5</sup>. A terapia mais eficiente necessita de melhor entendimento do processo patológico e biológico que levam ao desenvolvimento do tumor e da metástase.

A língua tem grande incidência de disseminação de metástase<sup>2,5</sup>. Em torno de 30% dos tumores iniciais da boca, o paciente terá linfonodo clinicamente positivo e 20% a 60% com metástase oculta<sup>3,4</sup>. A extensão do tratamento cirúrgico do pescoço negativo no câncer inicial da cavidade oral, se baseando na clínica, nas imagens e nos marcadores moleculares, ainda é controverso<sup>3,4</sup>.

Um modelo animal que mimetize o mais próximo possível o tumor oral humano, seria o ideal para as pesquisas. A medicina translacional direciona para o melhoramento dos índices epidemiológicos acima mencionados. Gera um ciclo contínuo, leito –bancada –leito, onde leva a pergunta do leito (paciente) para a bancada (laboratório) e o laboratório responde ou sugere parcial ou totalmente aos anseios dos profissionais para levar ao diagnóstico e ao tratamento do paciente (leito)<sup>6,7</sup>.

A identificação dos eventos moleculares que regulam a patogênese, a progressão e a resposta do câncer ao tratamento, podem proporcionar marcadores e tratamentos alvos específicos, reduzindo a morbidade da doença<sup>8,9</sup>. A investigação molecular do processo da carcinogênese é mimetizado através de modelos em animais que replicam a patologia e a epidemiologia humana<sup>8,9</sup>. Dessa forma, o modelo animal em roedores para o câncer oral tem facilitado a essa investigação<sup>8,9</sup>.

A escolha de um modelo animal que reproduza o câncer oral com a biologia do seu microambiente natural associado a disseminação, é importante para o entendimento da progressão e do seu prognóstico<sup>1,2,8,9</sup>. Dessa forma, os experimentos em animais são essenciais para o entendimento dos mecanismos básicos por detrás da malignidade e proporcionar a descoberta de métodos para a prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer<sup>8,9,10</sup>.

Os modelos animais descritos na literatura para os estudos do câncer são realizados em animais imunossuprimidos<sup>1,2,8,9</sup>. Apesar desses modelos terem grande importância para o conhecimento da patologia do câncer e para o desenvolvimento de novas drogas, existem pontos que não podem ser esclarecidos em animais imunossuprimidos, como a ausência da resposta imunológica contra as células tumorais, diminuindo a reprodução da similaridade com os tumores humanos<sup>11</sup>. Independente do tratamento realizado, a imunidade é importante para completar a resposta do hospedeiro na cura do paciente<sup>12</sup>. Observando esse conceito, o estudo ideal deveria ser realizado em um modelo animal imunocompetente. Assim, uma forma de validar os estudos da relação tumor-hospedeiro no seu ambiente natural primário e secundário, como também para

responder as questões da ausência imunocompetência descrita na literatura<sup>12</sup>.

O tumor de Ehrlich é um tumor epitelial pouco diferenciado derivado da mama de camundongo. Foi identificado nesse tumor em sua forma ascítica (existe na forma de ascite na cavidade peritoneal e sólida em partes moles) a alfa-1-antitripsina (A1AT), uma fosfoproteína da família da serina inibidora de protease, similar a outras serinas, que foram identificadas com níveis elevados em paciente com carcinoma epidermoide da cavidade oral<sup>13,14,15</sup>. Dessa forma de entendimento, acredita-se que o tumor de Ehrlich pode mimetizar o câncer oral humano quando implantado na língua de camundongos.

Esse estudo foi desenvolvido em um modelo de carcinogênese animal na língua de camundongos Swiss imunocompetente com tumor de Ehrlich. Esse tumor implantado na boca de camundongo Swiss, simula o câncer de língua humano no estágio inicial, reproduzindo a patologia e a epidemiologia humana com a disseminação linfática cervical.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas Swiss albino, com 12 semanas de idade, pesando 27g, armazenadas em caixas plásticas (5 animais por caixa) com a temperatura ambiente de  $20 \pm 2$  °C com ciclo de 12h claro/escuro, iniciando a luz as 6h com água e ração *ad libitum*. Pesquisa Aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animal – CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB) 66063/2007. Não há conflito de interesse.

O tumor de Ehrlich foi obtido em líquido ascítico mantido na cavidade peritoneal de camundongos Swiss, com passagens peritoneais no período de uma semana, através do transplante de  $1 \times 10^6$  células tumorais. O líquido ascítico foi coletado através de punção intraperitoneal utilizando seringa estéril. A contagem de células do líquido ascítico foi realizado no hemocítometro de Neubauer, com 99% de viabilidade celular observado pelo coloração do azul Trypan pelo método de exclusão.

Quinze camundongos foram induzidos com tumor de Ehrlich e cinco como grupo controle sem tumor com PBS (Phosphate Buffered Solution). Os animais foram anestesiados com a administração intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg) com a solução final de uma dose de 0.1 mL/30g. Um volume de 10 $\mu$ l ( $1,25 \times 10^6$  células viáveis) de suspensão de células de tumor ascítico de Ehrlich foi diretamente injetado na submucosa do terço anterior da borda esquerda da língua dos camundongos utilizando uma agulha de insulina com 30G de diâmetro. O grupo negativo (controle sem tumor) recebeu uma solução de PBS com o mesmo protocolo, simulando a indução com células tumorais.

Os animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada um deles (groups I, II, III e IV). Grupo I (GI), controle negativo sem tumor, com PBS, permaneceram vivos por 45 dias (tempo total do experimento); grupo II (GII), controle positivo induzido com tumor; grupo III (GIII) com tumor, os animais foram

eutanaziados após 48h da indução, e grupo IV (GIV) com tumor, onde os tumores da língua foram ressecados após 48h da indução e os animais foram deixados vivos por 45 dias (tempo total do experimento). Durante o desenvolvimento dos tumores, foi observado o estado geral de saúde dos animais. Os parâmetros utilizados foram o peso, medido três vezes por semana e a perda de pêlo observados diariamente<sup>1,2,8</sup>.

Depois da eutanásia, o tumor da língua e os linfonodos cervicais foram analisados macroscopicamente *in situ*, e depois completamente excisados e fixados em formol tamponado a 10% por 24h, transferido para álcool a 70%, e incluído na parafina com um processador automático (OMA® DM-40, São Paulo, Brasil), com cortes de 5mm de espessura no micrótomo manual Leica RM2235 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (H-E) para análises histológicas no microscópio de luz. Na realização dos testes de imunohistoquímica foram utilizados anticorpos humanos monoclonais AE1/AE3 (pan-citoqueratina)<sup>16</sup>, para a pesquisa de metástase oculta nos linfonodos cervicais, não visualizadas na coloração H-E.

## RESULTADOS

Todos os animais (do GI e GIV) permaneceram com bom estado geral até o final do experimento em 45 dias. Todos os animais (100%) induzidos com tumor de Ehrlich (GII, GIII e GIV) desenvolveram tumor na língua.

No GI nenhum animal desenvolveu tumor ou teve perda de peso ou de pêlo.

No GII, todos os animais (100%) foram eutanaziados no sétimo dia com um tumor volumoso e infiltrante que acometia toda a língua oral. Nesse tempo iniciaram a perda de peso. Havia aumento macroscópico dos linfonodos e presença de metástase patológica ao exame de H-E em todos os animais do grupo.

No GIII foi observado clinicamente um tumor nodular submucoso na borda da língua, houve o implante do tumor em todo o grupo (100%) – Figuras 1 e 2. O pescoço estava clinicamente normal sem linfonodo palpável na região submandibular. Microscopicamente foi confirmado tumor de Ehrlich em todas as línguas examinadas, com ausência de infiltração ou necrose. Os linfonodos submandibulares se encontravam com aspecto normal macroscopicamente. Microscopicamente não foi observado metástase na coloração de hematoxilina-eosina (H-E) em nenhum linfonodo. No estudo de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais AE1/AE3, foi diagnosticado metástase nos linfonodos cervicais em todos os animais desse grupo (100%).

No grupo IV igualmente ao grupo II e III, no segundo dia da indução, havia em todos os animais um tumor nodular na língua que foi ressecado, sob anestesia geral intraperitoneal. Os animais desse grupo permaneceram vivos por 45 dias. Nenhum animal perdeu peso ou pêlo, mantendo a mesma média de peso e aspecto clínico de saúde geral do grupo controle (GI). No quadragésimo



Figura 1. Segundo dia da indução do tumor de Ehrlich. Nódulo na borda esquerda da língua no GIII. Camundongo anestesiado.

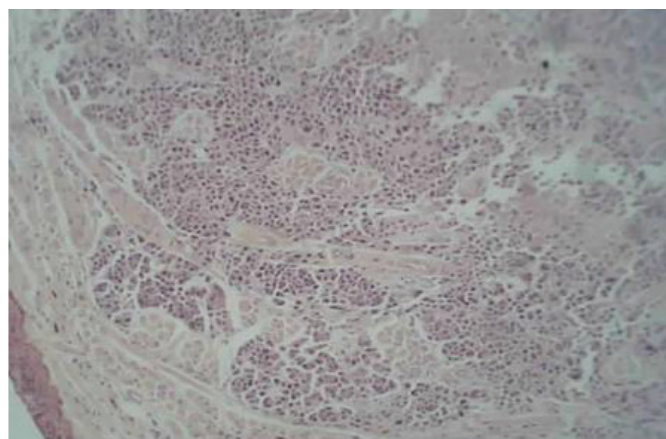
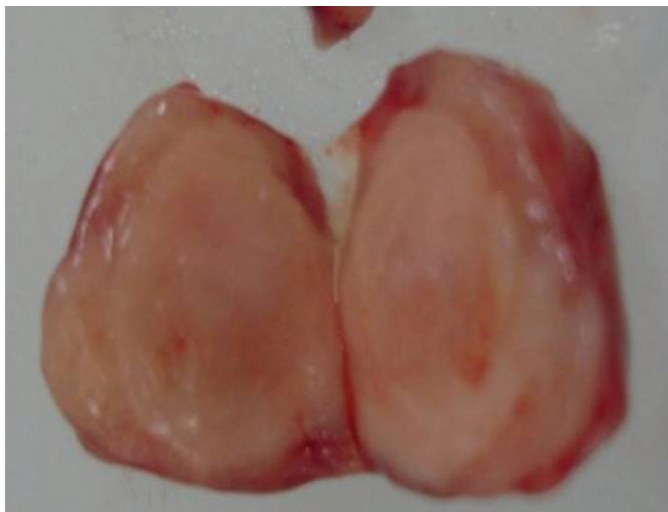


Figura 2. Histologia em H-E de tumor de Ehrlich na língua de camundongo do GIII, no segundo dia de indução do tumor de Ehrlich.



Figura 3. Metástase cervical submandibular bilateral no GIV, após 45 dias da retirada do tumor inicial da borda esquerda da língua do camundongo Swiss.



**Figura 4.** Macroscopia da metástase cervical submandibular do tumor de Ehrlich no GIV, após 45 dias da retirada do tumor inicial da borda esquerda da língua do camundongo Swiss.

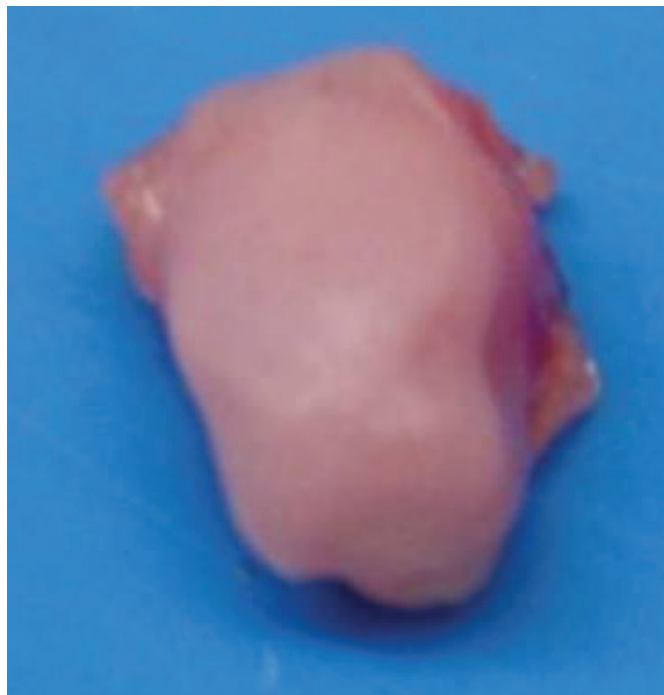
quinto dia da indução, no grupo IV ao exame clínico, houve o aparecimento de metástase cervical submandibular bilateral em um animal (20%) – Figuras 3 e 4. Não havia nenhuma recidiva na língua, que foi confirmado pela histologia com H-E (Figuras 5 e 6). As metástases foram confirmadas pelo exame histológico por H-E.

## DISCUSSÃO

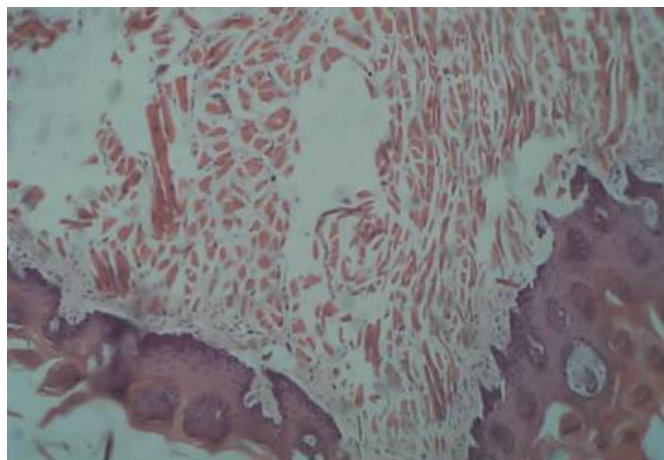
Os pacientes com patologias de Cabeça e Pescoço tratados com tumores de boca, falham no tratamento com a recidiva regional ou com a metástase a distância, na maioria das vezes levando o paciente ao óbito por serem essas metástases irremediáveis<sup>1,4,8</sup>.

Nesse estudo é descrito um modelo experimental com tumor de Ehrlich induzido na língua de camundongos Swiss (imunocompetente), de aparecimento clínico rápido e precoce (48h), com a disseminação metastática para linfonodos cervicais (loco regional) precocemente diagnosticada no exame de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais AE1/AE3 (pan-citoqueratina) em 100% dos animais, e o desenvolvimento tardio de metástase ganglionar clínica e histológica somente em 20% dos murinos, confirmada pela histologia com H-E, sem recidiva local em 100% dos animais. Dessa forma acredita-se que esse modelo experimental se aproxima do comportamento ao câncer na língua humana no que se refere a origem epitelial, algumas proteínas do microambiente, o sistema imunológico ativo, a disseminação linfática cervical, a clínica e o comportamento epidemiológico, de acordo com a literatura consultada. Esse estudo exemplifica a medicina translacional e pode contribuir para o entendimento do comportamento biológico dos tumores de boca em seres humanos.

Atualmente todos os modelos animais descritos na literatura para reproduzir o câncer oral humano, utiliza o enxerto de células de câncer de boca humana, em



**Figura 5.** Aspecto da língua após 45 dias de retirado o tumor, GIV



**Figura 6.** Microscopia com H-E da língua sem tumor após 45 dias de seguimento, GIV

animais imunossuprimidos, onde esses modelos estão longe de representarem o ideal<sup>1,2,8,9,11,12,17</sup>. Porém, são os modelos disponíveis para os estudos de drogas e tratamentos, segundo a literatura consultada, que mais se aproxima do câncer humano. A crítica que se faz nesses modelos é devido a ausência de imunidade dos animais, fator importante para mimetizar o ambiente natural dos tumores humanos<sup>1,2,8,9,11,12,17</sup>. Pois, o sistema imunológico é importante para a cura e o comportamento biológico do tumor, independentemente do tratamento utilizado<sup>12</sup>.

A escolha de um modelo animal ideal, deve reproduzir o microambiente tumoral com o sistema imunológico ativado o mais próximo do real. Bem como o

processo de infiltração e disseminação do tumor também é fundamental no entendimento da relação entre o tumor e o hospedeiro, para testes de medicamentos e abordagens terapêuticas no câncer<sup>17,18,19,20</sup>. O modelo animal imunocompetente é o mais apropriado para o estudo de tumores e suas respectivas metástases, porque a defesa do hospedeiro provavelmente será similar para qualquer tipo histológico de tumor, atuando o sistema imunológico com as mesmas vias de defesa<sup>12</sup>. Protocolos com animais imunocompetentes traduzem o microambiente da relação hospedeiro-tumor que mais se aproxima da simulação com o câncer do homem<sup>1,8,12</sup>. Acredita-se que experimento com animal imunocompetente pode proporcionar o entendimento do microambiente do hospedeiro com o tumor de Ehrlich, mimetizando a relação hospedeiro-tumor com a consequente metástase<sup>21,22</sup>.

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia maligna epitelial de camundongo que pode se desenvolver nos camundongos na forma ascítica ou sólida. Na forma ascítica foi identificado uma fosfoproteína, a serpina alfa-1-antitripsina (A1AT) da família das serinas inibidoras de proteases<sup>14</sup>, e similar a outras proteínas da mesma família<sup>23</sup>. Esse polipeptídeo é o mais ativo no microambiente do tumor de Ehrlich<sup>15</sup>. Essa proteína (A1AT) foi encontrada em níveis mais elevados no sangue de pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço quando comparados com o sangue de pacientes com tumores em outras regiões, principalmente em carcinoma escamoso da cavidade oral<sup>13</sup>. O tumor de Ehrlich é usado amplamente em camundongos imunossuprimidos para o estudo do microambiente tumoral e testar drogas<sup>21,24</sup> e segundo diversos autores, os resultados podem ser extrapolados para humanos<sup>19</sup>.

O modelo de tumor Ehrlich na língua de camundongos Swiss foi padronizado na língua por nosso grupo<sup>25</sup>, inicialmente com 50ul e depois foi reduzido para 10ul (com  $5 \times 10^6$  células). Atualmente, utiliza-se 10ul com  $1,25 \times 10^6$  células. Em acordo com a literatura consultada esse é o modelo com menor tamanho (diâmetro e volume tumoral clínico), com o mínimo de tempo da indução até a clínica (em 48h), mais prático, mais rápido, sem a necessidade de passagens sucessivas para o tumor ser mais agressivo e implantar, como nos modelos descritos<sup>1,2,8,9</sup>.

Dessa forma, partindo das premissas acima, utilizou-se o camundongo Swiss com tumor de Ehrlich. Esse com o metabolismo e comportamento biológico de tumor epitelial. Então, foi feita a hipótese, de que o modelo animal de tumor de Ehrlich induzido na língua de camundongos na forma sólida, poderia produzir alguns polipeptídeos do micro ambiente tumoral, semelhante a proteínas produzidas pelo carcinoma epidermoide oral em humanos. Assim, reproduzir o câncer de língua humano em um roedor com similaridades clínicas.

Os animais do GI se mantiveram com boas condições de saúde, traduzida pela elevação do peso e a ausência de perda de pêlos<sup>1,2</sup>.

No sétimo dia do GII, todos os animais foram eutanaziados quando iniciaram a perda de pêso e pêlo. No exame histopatológico, foi evidenciado infiltração da musculatura da língua. Havia necrose central no tumor. Outros autores também evidenciaram similaridades nos resultados com tumores de boca avançados<sup>8,9</sup>. Foi observado metástase cervical em todos os animais do grupo (100%), tanto pela macroscopia quanto por microscopia na coloração por H-E. Outros autores<sup>2</sup> também encontraram metástases nos linfonodos no sétimo dia de indução com a coloração de H-E no modelo de indução na língua ortotópico e imunossuprimido. Já alguns<sup>8</sup> observaram os mesmos resultados no octagésimo segundo dia. Esses dados também foram observados em humanos por alguns autores em tumores T4 de boca, onde 100% dos pacientes tiveram metástases clínica<sup>4,26</sup>.

NoGIII, após 48h da indução, iniciou-se o aparecimento do tumor clínico visível como um nódulo na submucosa da borda esquerda da língua, com a presença de um halo hiperêmico no local induzido (Figuras 1 e 2). Nesse tempo, não havia nenhum linfonodo cervical clínico ou macroscópico, bem como a histologia com coloração H-E foi negativa para metástase. A imunohistoquímica com AE1/AE3 foi positiva para o diagnóstico de 100% de metástases nos linfonodos cervicais, em todo o grupo. Alguns autores<sup>2</sup> realizaram na língua de camundongos Balb/c nu/nu em modelo ortotópico, a inoculação de 50ul da solução contendo células tumorais humanas marcadas com proteína verde fluorescente ("green fluorescent protein transfected tumor cell"). Observaram através da microscopia pela excitação de fótons fluorescentes que as células do tumor atingiam os linfonodos cervicais depois de 24h da indução em 100% dos animais. Eles explicaram que a pressão exercida nos capilares linfáticos pelo volume de 50ul, poderia ter favorecido a disseminação linfática dessas células e ocasionar a metástase precoce. Outros autores<sup>8</sup> em um modelo ortotópico em animais nude utilizando células de tumor humano marcadas com luciferase ("luciferase-transduced cells"), com o mesmo volume de 50ul de uma solução contendo células de tumor de boca humano, através da imagem de bioluminescência, também encontraram a progressão das células metastáticas para os linfonodos cervicais em 100% dos animais, porém, somente no décimo segundo dia da indução do tumor. E no décimo terceiro dia, a metástase foi confirmada pelo exame histológico pela coloração de H-E. De acordo com o exposto, acreditamos que no modelo animal com uma solução contendo células de tumor de Ehrlich em um volume (cinco vezes menor) de 10ul, pode não ter exercido, ou exerceu a mínima pressão capilar linfática local para a mesma ocasionar a difusão de células neoplásicas para os linfonodos cervicais. Independente do volume de indução do tumor, o fato mais importante dessas observações é que as células tumorais atingiram em 100% das vezes os linfonodos nos diversos estudos. E nem todas evoluíram no mesmo período

ou sobreviveram no sítio metastático com o passar do tempo, tanto com o tumor primário presente ou após a retirada do mesmo, como se verá adiante.

Um paralelo pode ser feito com a epidemiologia do câncer inicial de boca em humanos (T1-T2N0). As metástases precoces para linfonodos cervicais também estão presentes, mesmo com ausência de metástase clínica ou radiológica<sup>4,26</sup>. Nos pacientes<sup>4,26</sup> em que se realiza o esvaziamento cervical profilático, encontram-se metástases ocultas (não visualizadas pela clínica ou pela radiologia) diagnosticadas pela coloração de H-E entre 7,5% a 69% e nos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo com linfonodos negativos pela H-E, de 5% a 58% de metástase são diagnosticadas pela imunohistoquímica<sup>3,4,26</sup>. E ainda quando o exame de imunohistoquímica se encontra negativo, ao exame genético desses linfonodos<sup>3</sup> (negativos pela histologia e pela imunohistoquímica), se encontra metástase em 20%, com valor predictivo negativo de 100%. Apesar dos desses dados mencionados, quando os tumores iniciais na língua são operados, a literatura aceita duas condutas para o tratamento do pescoço. Realizar o esvaziamento cervical seletivo profilático ou observar com seguimento<sup>3,4,26</sup>. No GIV, após 48h da indução, quando houve o primeiro sinal clínico da neoplasia maligna, o tumor foi retirado da língua, e os animais foram deixados vivos por 45 dias. Tempo em que apareceu clinicamente a metástase cervical submandibular bilateral em um animal (20%) – Figuras 3 e 4. Nesse tempo da eutanásia, não havia recidiva de tumor local na língua (fig. 5) em todos os animais do grupo, confirmado pela histologia com H-E (fig. 6). Assim, o tumor primário foi controlado em 100% dos casos. Sano e Myers<sup>8</sup>, retiraram cirurgicamente os tumores da língua dos animais no décimo terceiro dia, e observaram o crescimento de metástase cervical clínica em 69 dias após ressecção, sem recidiva na língua. Dados semelhantes foram observados em seres humanos<sup>4</sup>, com tumores iniciais de boca (T1-T2N0). Quando não se realizou o esvaziamento cervical profilático após a retirada do tumor da boca, houve a recidiva cervical com metástase clínica tardia em 31,8% dos pacientes, sendo o tumor primário da boca controlado.

Um dado interessante desse experimento animal em tela é que tumor foi induzido na borda esquerda da língua sem ultrapassar a linha média, e tanto clinicamente quanto histologicamente, ocorreu metástase clínica tardia bilateral. Essa observação também foi encontrada em pacientes com tumores iniciais de boca. Em cinco anos de seguimento, ocorreu metástase contra-lateral em 1,3 a 3% dos casos<sup>4,26</sup>.

Os animais tiveram 100% metástase nos linfonodos cervicais. E somente em 20% houve metástase clínica tardia após a retirada do tumor da língua. Provavelmente o sistema imunológico ativo destruiu o restante das metástases linfáticas. Diante dos resultados do experimento e das similaridades com epidemiologia do câncer inicial de boca em humanos, pode-se inferir por analogia, que no homem poderia ocorrer o mesmo

evento. Na presença de um tumor de língua, ocorreria metástase microscópica em todos os pacientes, porém, após a retirada da neoplasia primária, somente um percentual desenvolveria tumor metastático clínico nos linfonodos, por provável destruição das metástases pelo tecido linfático semelhante aos dos animais desse estudo. Desse modo, a pergunta que se faz e nos direciona para novos estudos é: Quem são os indivíduos que terão as células tumorais metastáticas destruídas e os que não terão essas células eliminadas? Talvez esse modelo experimental possa colaborar nos estudos futuros nessa direção.

A literatura clama em encontrar um modelo experimental em animal imunocompetente que mais se assemelhe ao homem, com tumores iniciais que reproduzam o micro-ambiente da relação tumor-hospedeiro e metástase regional precoce<sup>1,2,8,9,11,2,17,19</sup>. Pois nos modelos existentes, os tumores quando aparecem já são grandes, criando dificuldade para a eficácia dos estudos de micro ambiente e de tratamento de novas drogas, comprometendo a sua real eficácia<sup>11,17</sup>. Pois quanto mais precoce e menor se detecta o tumor, melhor o resultado do tratamento empregado<sup>11,17</sup>. Acredita-se que o tumor epitelial de Ehrlich na língua em camundongos Swiss, com o sistema imunológico ativo, pode responder nesse momento a necessidade da literatura do modelo ideal mimetizando a biologia e a epidemiologia do câncer oral humano em todos os seus estágios.

Dessa forma, os resultados demonstram que o tumor de língua em animal imunocompetente, diferente da literatura consultada onde somente existe animais imunossuprimidos, é um modelo eficiente para reproduzir o desenvolvimento rápido de neoplasia maligna, com o diagnóstico clínico de tumor inicial pequeno<sup>11,17</sup>, com metástase regional. Reproduz na íntegra a epidemiologia humana nos tumores iniciais de boca, com as metástases ocultas, bem como no seguimento de recidiva cervical tardia. É mais um modelo experimental que se aproxima do homem, para estudos de microambiente tumoral na relação hospedeiro-tumor, traduzindo-se no entendimento da epidemiologia, bem como para estudos de drogas e terapêuticas no tratamento do câncer oral. Traz a importância do laboratório para responder as perguntas realizadas pela clínica, mimetizando a epidemiologia da patologia do homem. Assim, caracterizando a importância da medicina translacional. Onde o pesquisador vai no leito fazer a pergunta, e retorna ao laboratório para buscar a resposta. Depois de encontrada, retorna ao leito para tratar o paciente.

## CONCLUSÃO

Foi apresentado um modelo de tumor epitelial de Ehrlich em camundongos imunocompetentes, nos diversos estágios de evolução local e metástase ganglionar cervical, mimetizando o câncer oral humano. Nesse modelo 100% dos animais induzidos tiveram

tumor na língua e 100% tiveram inicialmente metástase cervical oculta. Quando foi retirado o tumor da língua, somente 20% dos animais permaneceram com metástase cervical, que evoluiu no seguimento clínico. Nos outros 80% não houve crescimento local nem recidiva ganglionar. Provavelmente esse comportamento biológico do tumor na língua dos murinos pode ocorrer no homem.

Foi desenvolvido um protocolo em animal singênico (implante de tumor em animal da mesma espécie), imunocompetente, rápido, prático e reproduzível que poderá ser útil em estudos para o entendimento da relação hospedeiro-tumor no seu micro ambiente local e metastático. Onde podem ser realizados estudos para novas drogas e tratamentos do câncer oral humano. Dessa forma, um modelo experimental evidenciando a medicina translacional, levando as perguntas da clínica para o laboratório, e retornando as possíveis respostas do laboratório para a clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Sano D, Myers J N Xenograft models of head and neck cancers. *Head & Neck Oncology*. 2009; 1:32.
2. Szaniszló P, Fennewald SM, Qiu S, Kantara C, Shilagard T, Vargas G, Resto VA Temporal characterization of lymphatic metastasis in an orthotopic mouse model of oral cancer. *Head Neck*. 2014; 36:1638-47.
3. Ferlito A, Rinaldo A, Devaney K O, Nakashiro Koh-ichi, Hamakawa H Detection of lymph node micrometastases in patients with squamous carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008; 265:1147-1153.
4. Huang S-Fu, Chang J Tung-Chieh, Liao Chun-Ta, Kang Chung-Jan, Lin Chien-Yu, Fan Kang-Hsing, Wang Hung-Ming, Chen I-How The Role of Elective Neck Dissection in Early Stage Buccal Cancer. *Laryngoscope*. 2015; 125:128-133.
5. Stoeckli SJ, Alkureishi LW, Ross GL. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:787-793.
6. Pelizzo G, Avanzini MA, Cornglia AI, Osti M, Romano P, Avolio L, Maccario R, Dominici M, De Silvestri A, Andreatta E, Costanzo F, Mantelli M, Ingo D, Piccinno S, Calcaterra V Mesenchymal stroma cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pré-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med*. 2015; 213:219
7. Park I-S, Chung P-S, Ahn JC Enhancement of Ischemic Wound Healing by Spheroid Grafting of Human Adipose-Derived Stem Cells Treated with Low-Level Light Irradiation. *PLoS ONE*. 2015; 10: 0122776.
8. Myers J N, Holsinger FC, Jasser SA, An Orthotopic Nude Mouse Model of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:293-298.
9. Qiu C, Wu H, He H, Qiu W A Cervical Lymph Node Metastatic Model of Human Tongue Carcinoma: Serial and Orthotopic Transplantation of Histologically Intact Patient Specimens in Nude Mice. *J Oral Maxillofac Surg* . 2003; 61:696-700.
10. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DAH, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Journal of Cancer*. 2010; 102: 1555 – 1577.
11. Hunter K W Mouse models of cancer: does the strain matter? *Nature Reviews-| Cancer*. 2012; 12:144-9.
12. Coventry B J, Ashdown M L Complete clinical responses to cancer therapy caused by multiple divergent approaches: a repeating theme lost in translation. *Cancer Management and Research*. 2012;4: 137-49.
13. Shirasuna K, Sugiyama M, Watatani K, Morioka S, Hayashido Y. Serum alpha-1-antitrypsin in patients with malignant tumors occurring in the oral region. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1987; 16:516-20.
14. Donenko FV, Ziganshin RH, Anisimova NY, Voyushin KE, Sitdikova SM, Amandzholov BS, Kiselevskii MV, Efferth T. Identification of serpin (alpha-1-antitrypsin) as serum growth inhibitory factor in murine ehrlich carcinoma by proteomics. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010; 7:147-56.
15. Binas B, Grosse R, Eckert K, Widmaier R, Lübke L. Secretion of phosphoproteins associated with neoplastic transformation and with the action of transforming growth factors. *Biochem Int*. 1985;11:453-65.
16. Koenig A M, Prenzel K L, Bogoevski D, Yekebas E F, Bubenheim M, Faithova L, Vashist Y K, Gawad KA, Baldus S E, Pantel K, Schneider P M, Ho Ischer A H, Izbicki J R Strong Impact of Micrometastatic Tumor Cell Load in Patients with Esophageal Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2009, 16:454-462.
17. Hollingshead M G Antitumor Efficacy Testing in Rodents. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100: 1500 – 1510.
18. Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T Stimulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Bone-Derived Transforming Growth Factor-B Enhances Bone Metastases in Breast Cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2067-73.
19. Ran S, He J, Huang X, Soares M, Scothorn D, Thorpe PE Antitumor Effects of a Monoclonal Antibody that Binds Anionic Phospholipids on the Surface of Tumor Blood Vessels in Mice. *Cancer Research*. 2005; 11: 1551-62.
20. Chen B, Pogue B, Zhou X, O'Hara JA, Solban N, Demidenko E, Hoopes P J, Hasan T Effect of Tumor Host Microenvironment on Photodynamic Therapy in a Rat Prostate Tumor Model. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 720-7.
21. Gerzeli G, Freitas I, Bono B, Griffini P, Baronzio GF, Bertone V Italic Enzyme histochemical studies on tumor blood vessels. *J Anat Embryol*. 1995;100:299-307.
22. Oliveira S I, Andrade L NS, Onuchic A C, Nonogaki S, Fernandes P D, Pinheiro M C, Rohde C BS, Chammas R, Jancar S Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010; 10:200.
23. David H, Perlmutter II, Joslins G, Nelson P II, Schasteen C, Adams S P, Fallon Q RJ Endocytosis and Degradation of a1-Antitrypsin-Protease Complexes Is Mediated by the Serpin-Enzyme Complex (SEC) Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1930, 28: 16713-16.
24. Weill PR, Frussa-Filho, L.V. Bonamin Effect of a submaxillary gland extract on Ehrlich tumor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999; 32: 1205-9.
25. Bicalho LS, Longo J P F, Cavalcanti C E O, Simioni A R, Bocca A L, Santos Maria FMA, Tedesco AC, Azevedo RB Photodynamic Therapy Leads to Complete Remission of Tongue Tumors and Inhibits Metastases to Regional Lymph Nodes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2012; 9: 1-8.
26. Jang W, Wu H-G, Park C, Kim K H, Sung M-W, Kim M-J, Choung P-H, Lee J-H, Choi J-Yo Treatment of Patients with Clinically Lymph Node-negative Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity . *Jpn J Clin Oncol*. 2008;3 8: 395-401.