

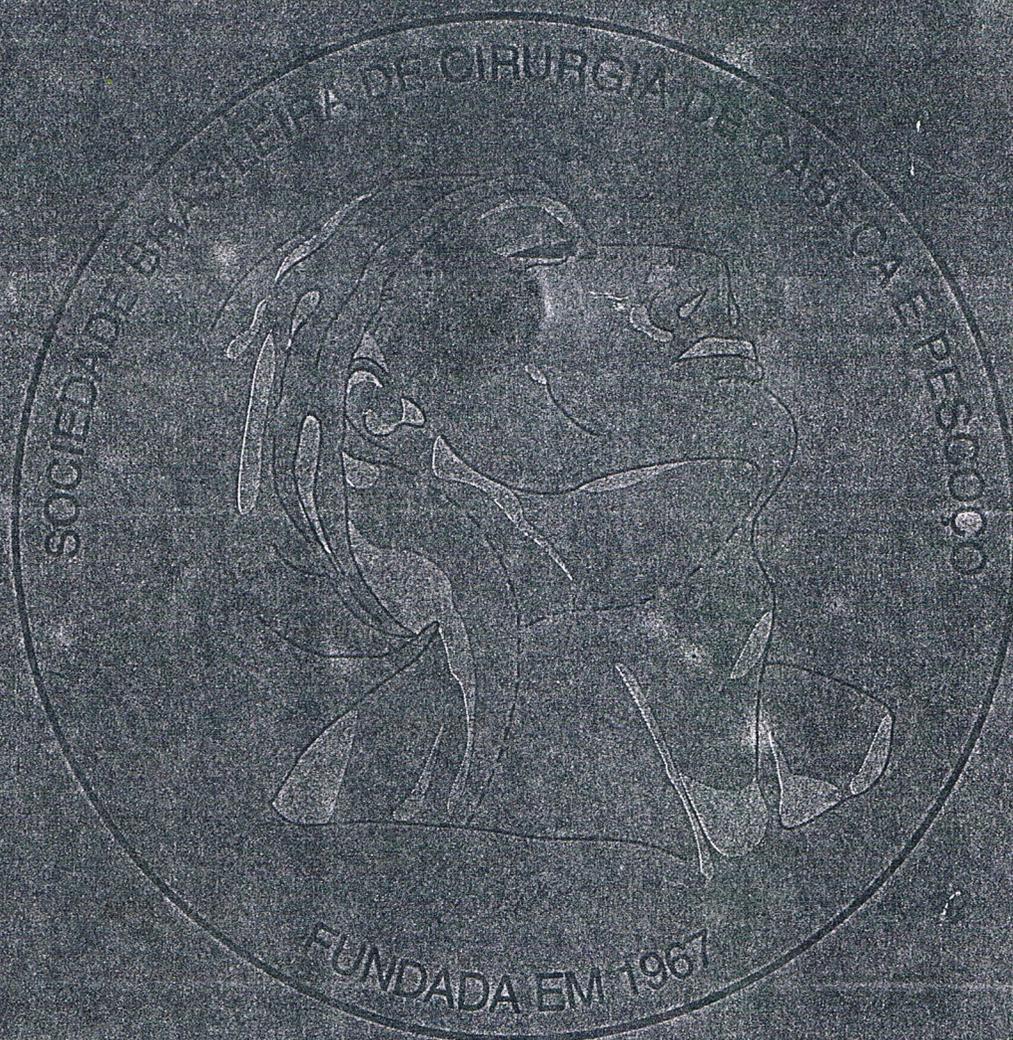
Revista Brasileira de CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e da Federação Sul Americana de Sociedades de Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Volume 27 - Nº 2 - 2002

Abril/Junho

ISSN 0100-2171



- ❑ *Utilização do Retalho Perfurante Anterolateral da Coxa na Reconstrução de Cabeça e Pescoço: Estudo Anatômico e Aplicações Clínicas;*
- ❑ *Padronização de modelo experimental para a Carcinogênese, com a administração Oral de 4-Nitroquinoleína-1-Óxido (4NQO): Estudo do campo de Cancerização no Camundongo;*
- ❑ *Conduta no Câncer da Boca;*
- ❑ *Conduta no Câncer da Laringe;*
- ❑ *Conduta no Câncer da Tireóide;*
- ❑ *Relato de Caso: Metástase de Carcinoma de Células Renais para Soalho de Boca;*
- ❑ *Uso da Incisão Cervical em "T" na Cirurgia Conservadora em Tumores de Laringe e Seio Piriforme;*
- ❑ *Doenças das Glândulas Parótidas e Submandibulares em Pacientes Infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana: Estudo Prospectivo Clínico Histopatológico;*
- ❑ *Pré e Pós-Operatório nas Cirurgias dos Tumores da Cabeça e Pescoço no Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - FESP - UPE*

PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA A CARCINOGENESE, COM A ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 4-NITROQUINOLEÍNA-1-ÓXIDO (4NQO): ESTUDO DO CAMPO DE CANCERIZAÇÃO NO CAMUNDONGO

EXPERIMENTAL MODEL STANDARDIZATION TO CARCINOGENESIS BY ORAL ADMINISTRATION OF 4-NITROQUINOLINE-1-OXIDE (4NQO): A STUDY OF FIELD CANCERIZATION IN MOUSE

CLÁUDIO E. CAVALCANTI¹
FERNANDO A. ANDRADE²
ANTÔNIO E. SANT'ANA³
JULIANA GUIMARÃES⁴
MARIA C. VASCONCELOS⁵
CARLOS A. O. CAVALCANTI⁶
RENATA C. DE ALENCAR⁷

DANIEL C. M. CAVALCANTI⁷
MARIA C. C. PUGLIESI⁷
FLÁVIO CAXICO⁸
MARTA DA SILVA⁸
MARIANA M. MELO⁷
ANA BRITO⁹
GLAUCO C. MANSO¹⁰

Trabalho realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Reconstructora – Setor de Tumores de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da UFAL. Vencedor do Prêmio Jorge de Marsillac, no XVIII Congresso Brasileiro de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, em Recife-PE, em Setembro de 2001.

Palavras-chave: carcinogênese, nitroquinoleína, campo de cancerização
Key words: carcinogenesis, nitroquinoleine, field cancerization

Submetido: 25 de Maio de 2002

Aprovado: 8 de Julho de 2002

RESUMO

O aparecimento do segundo tumor primário é explicado pelo conceito do campo de cancerização, o qual é fundamentado pela origem policlonal do câncer. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental de carcinogênese em camundongos pela indução com a 4-Nitroquinoleína-1-Óxido (4NQO) por via oral e observar as evidências da existência do campo de cancerização. Na metodologia, foram utilizados o total de 61 camundongos, distribuídos em dois grupos: grupo I - 10 animais, (grupo

controle) e grupo II - 51 animais que receberam 4NQO, por administração oral, diluído na água com concentração de 0,001%, durante 32 semanas. O resultado mostrou que, no grupo induzido ao câncer pela 4NQO, houve o óbito de 21 animais (41,2%), enquanto 18 (35,39%) desenvolveram tumores sistêmicos. Houve, em dois casos, tumores malignos com histologia variada em tecidos diferentes, nove casos de neoplasias na fase de promoção e seis na fase de conversão. Dois camundongos apresentaram a segunda e a terceira fases da carcinogênese em órgãos diferentes e, em um animal, estas ocorreram no mesmo órgão. Conclui-se que a 4NQO desenvolveu tumores malignos e benignos em camundongos simultaneamente em um mesmo animal, no mesmo órgão ou em órgãos distintos. Deu-se mais um suporte à teoria do campo de cancerização.

Endereço para correspondência:

Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti
Rua Íris Alagoense, 267 - 57050-000
Farol - Maceió - AL
Fone (fax): (82) 221-5152
E-mail: ccirurc@bol.com.br / ceoc@fapeal.br

ABSTRACT

The second primary tumor can be explained by the "field cancerization" concept, which is supported by the polyclonal cancer origin. The aim of the present study was to develop an experimental carcinogenesis model in mice induced by oral administration of 4-nitroquinoline-1-oxid (4NQO) and to evidence the existence of field cancerization. In the methodology, 61 mice, divided into two groups were used:

1 - Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica e Reconstructora – Setor de Tumores da Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL); 2 - Professor Coordenador da Disciplina de Cirurgia Plástica e Reconstructora do Departamento de Cirurgia da UFAL; 3 - Professor Adjunto do Departamento de Química da UFAL; 4 - Patologista do Departamento de Patologia do Hospital Universitário da UFAL; 5 - Professor Adjunto do Departamento de Patologia do Hospital Universitário da UFAL; 6 - Professor Colaborador do Departamento de Cirurgia da Universidade de Alagoas (UNCISAL); 7 - Acadêmica de medicina da UFAL; 8 - Biólogo do Biotério Central da UFAL; 9 - Chefe do Biotério Central da UFAL; 10 - Chefe do Departamento de Cirurgia da UFAL.

group I, 10 animals, (group-control) and group II, 51 animals, treated with 4NQO, in drinking water with the concentration of 0,001%, during 32 weeks. The results showed that, in the 4NQO-induced carcinogenesis group, death occurred in 21 animals (41,2%). Systemic tumors were observed in 18 mice (35,3%). In 2 cases, there were malignant tumors with varied histology in distinct tissues. Nine cases of tumors in promotion phase and six in the conversion phase were observed. Two mice with the second and the third phases of carcinogenesis were noted, while in one animal they occurred in the same organ. It concludes that 4NQO induced malignant and benignant tumors in mice in the same organ or in distinct ones. It gives one more support to field cancerization theory.

INTRODUÇÃO

A explicação mais aceita para o aparecimento do segundo tumor primário é o conceito do campo de cancerização^{1,2,3}. Segundo esta teoria, não somente o sítio acometido pelo tumor, mas também todas as mucosas dos tratos aerodigestivo superior e respiratório estão comprometidas, possuindo alterações cromossômicas, assemelhando-se a um único e extenso "lençol de cobertura mucosa" para as diversas regiões anatômicas². A origem policlonal fundamenta essa teoria.

De acordo com alguns autores^{4,5}, após o estabelecimento do tumor primário, uma célula pode desgarrar-se deste e desenvolver novo sítio neoplásico, podendo sofrer mudanças genéticas. Da mesma maneira, a neoplasia inicial pode desenvolver novas mudanças genéticas, com a evolução tumoral. Assim, os tumores podem apresentar diferentes alterações genéticas não traduzindo necessariamente origens de clones diferentes. Esses autores defendem a teoria monoclonal para explicar o aparecimento de tumores segundos primários e afirmam que estas lesões ocorrem por disseminação intraepitelial ou por implantes de células desgarradas do tumor primário, e não como neoplasias independentes originadas por clones diferentes.

Os vários estádios da carcinogênese são por ordem de ocorrência: iniciação ou indução, promoção e progressão ou conversão⁶. A iniciação ou indução ocorre quando uma porção do DNA é permanentemente alterada. A promoção acontece em curto período de tempo ou após vários anos, quando as células "iniciadas" se expandem em nódulos, papilomas ou pólipos. A progressão é evidenciada quando a lesão pré-maligna se transforma em um carcinoma "in situ" ou invasivo.

A estratégia da quimioprevenção é desenhada com agentes que interferem efetivamente na carcinogênese agindo principalmente nas fases de iniciação ou indução e promoção do câncer. Os modelos de indução e quimioprevenção do câncer em animais já estão estabelecidos em ratos (pele, fígado, mama, cólon e próstata)⁷.

Os objetivos deste estudo foram observar a ação do agente indutor para o câncer 4-Nitroquinoleína-1-Óxido (4NQO) por via oral no camundongo, analisando a morfologia dos tecidos, e evidenciar a existência do campo de cancerização.

MATERIAL E MÉTODO

A Pesquisa foi aprovada pelo Conselho de Bioética da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) para experimentos com animais e realizada no Biotério Central da UFAL, no Laboratório do Departamento de Cirurgia da UFAL, no Laboratório do Departamento de Química da UFAL e no Departamento de Patologia da UFAL.

Foram utilizados 61 camundongos Swiss distribuídos em oito gaiolas e subdivididos em dois grupos. Quanto aos agentes químicos, o agente indutor da carcinogênese foi a 4NQO (laboratório Aldrich Chem.C., Milw., Wi 532010), por administração oral, diluída na água de beber, na concentração de 0,001%⁸. O agente fixador dos tecidos foi o formol tamponado e o método de coloração utilizado foi a hematoxilina-eosina.

Os animais receberam a alimentação fornecida pelo Biotério Central da UFAL e água "ad libitum". Foram armazenados em condições ideais de higiene e alimentação. Quanto ao alojamento, a temperatura e o ar foram ambientes. A temperatura variou de 26°C a 33°C e a umidade relativa do ar esteve elevada, como esperado para o clima do nordeste brasileiro.

Os animais foram divididos em dois grupos a saber:

Grupo I - Composto por 10 animais que não foram expostos ao agente químico durante o período em que se estabeleceu o experimento. Foram armazenados nas mesmas condições dos animais do grupo em teste, sendo considerado o grupo controle.

Grupo II - Composto por 51 roedores, que receberam a substância 4NQO como indutora da carcinogênese. Este grupo foi considerado o teste para a indução da doença. A substância química 4NQO foi administrada na água dos animais. A água era trocada uma vez por semana. O tempo de administração da 4NQO foi de 32 semanas.⁸

Após o término do experimento para cada grupo, os animais foram anestesiados com éter anestésico, por inalação. Estando os animais sacrificados, foi realizada a retirada dos órgãos comprometidos por tumor e da língua para representar a cavidade oral, com a presença de tumor ou não.

Quanto aos métodos patológicos, os tecidos foram fixados em formol tamponado, emblocados em parafina e seccionados na espessura de 3 mm. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina (H-E), de acordo com técnica padronizada de laboratório. Na análise histológica, estudou-se o grau de hiperplasia, displasia, metaplasia e a presença de câncer nos tecidos dos roedores estudados.

RESULTADOS

O experimento iniciou com 61 ratos. Houve a morte de 4/10 (40%) animais no grupo controle de causa desconhecida, não sendo evidenciado qualquer tipo de tumor em tal grupo. No grupo induzido ao câncer pela 4NQO houve o óbito de 21/51 (41,2%). Os animais morreram no fim de semana, não sendo possível realizar a necropsia devido à putrefação dos tecidos. Deste grupo, 18/51 (35,3%) animais desenvolveram

tumores sistêmicos. Doze animais 12/51 (23,5%) não desenvolveram tumores.

O grupo intoxicado pela 4NQO foi analisado quanto à presença de alterações na língua como órgão representante da cavidade oral. A primeira fase da carcinogênese (indução) é evidenciada através de marcadores tumorais com os métodos imunohistoquímicos. Tal análise está sendo feita no presente momento, na língua.

A segunda fase da carcinogênese (promoção) foi demonstrada através da presença de nódulo, pólipos, cistos, adenomas, neoplasia mesenquimal, hiperplasias, linfangiomas e cistoadenomas. A língua foi acometida por um nódulo em um animal (1/51, 1,9%). Na pele do abdome, observaram-se cistos dérmicos profundos em três casos e cistos epidérmicos e linfangiomas em dois casos. Na pele da face verificou-se a presença de lesão cística benigna com componente de células cubóides e mucosas próximas ao lábio superior em dois casos. Nos testículos, houve um caso de cistoadenoma, um caso de lesão cística adenomatosa benigna e um caso de neoplasia de células de Leydig. Já na vesícula seminal, houve um caso de cistoadenoma papilífero. No pulmão foi observado hiperplasia de pneumócitos em um caso.

No camundongo 43, a segunda fase da carcinogênese foi detectada em órgãos diferentes, através da ocorrência de cistos epidérmicos profundos e cistoadenoma papilífero de vesícula seminal.

As evidências da terceira fase da carcinogênese (conversão) foram demonstradas na ocorrência de 6 casos de adenocarcinoma papilífero em pulmão. Na pata de 1 animal ocorreu o desenvolvimento de uma neoplasia mesenquimal de provável origem neural ou muscular. A mesma ocorreu também na parede abdominal de outro rato, infiltrando o tecido muscular esquelético.

Os sinais da terceira fase da carcinogênese em órgãos diferentes e de histologia distinta no mesmo animal, foram observados no camundongo 17 e no camundongo 33. O primeiro apresentou adenocarcinoma papilífero de pulmão e neoplasia maligna mesenquimal de provável origem neural ou muscular da pata, enquanto no segundo foi detectado adenocarcinoma papilífero de pulmão e tumor mesenquimal infiltrativo de parede abdominal.

A segunda e a terceira fases da carcinogênese em órgãos distintos no mesmo animal puderam ser demonstradas tanto no camundongo 9, no qual surgiram adenocarcinoma papilífero de pulmão e neoplasia de células de Leydig, como também no camundongo 34, onde detectou-se adenocarcinoma papilífero de pulmão e cistos dérmicos profundos de parede abdominal.

Foi possível observar a segunda e a terceira fases da carcinogênese no mesmo órgão de um animal, o camundongo 35, que teve seu pulmão acometido por um adenocarcinoma papilífero e hiperplasia de pneumócitos.

DISCUSSÃO

Atualmente, a literatura encontra vários suportes que ex-

plicariam o campo de cancerização^{1,2,3}. Há também autores que discordam da teoria policlonal e justificam o aparecimento dos tumores malignos através da teoria monoclonal^{4,5}.

A teoria do campo de cancerização (policlonal) afirma que todos os epitélios agredidos por um mesmo agente carcinogênico respondem simultaneamente à agressão. Neste trabalho, a 4NQO agiu de forma sistêmica agindo simultaneamente na língua, pulmão, músculos, testículos, pois todos esses tecidos apresentaram alterações epiteliais ou neoplasias. Em um caso, verificou-se no mesmo animal adenocarcinoma de pulmão e tumor mesenquimal maligno na parede abdominal (camundongo 17) e, em outro animal, ocorreu adenocarcinoma de pulmão e tumor mesenquimal na pata (camundongo 33). Observou-se cânceres (terceira fase) de linhagens e de histologias diferentes, nos diversos tecidos simultaneamente. A presença em um mesmo animal de tumores malignos e benignos, bem como a evidência de duas neoplasias benignas em órgãos separados, denotam a segunda e a terceira fases da carcinogênese e a multicentricidade tumoral. Isso significa que a droga agiu nos diversos tecidos simultaneamente.

Na teoria monoclonal^{4,5}, todos cânceres devem no mínimo ter a mesma origem, sendo portanto do mesmo tipo histológico, independente da evolução clonal. Essa teoria afirma que o segundo tumor ocorre por disseminação "intraepitelial" ou por "implantes". Com tumores em órgãos distintos e histologias diferentes, fica difícil imaginar essa afirmação nos resultados encontrados neste estudo.

Vários autores demonstraram a eficiência do modelo experimental utilizado neste estudo para a formação de câncer na língua de ratos, utilizando a 4NQO com concentração de 0,001% na água de beber^{8,9,10,11,12,13}. No entanto, no estudo em questão, encontrou-se somente um nódulo na língua de um camundongo, porém foram observados tumores disseminados por todo o organismo dos animais, localizados no pulmão, músculo da parede abdominal e perna, além de cistos nos testículos e na pele. A maioria dos modelos experimentais descritos na literatura com a indução do câncer pela a 4NQO, administrada pela água de beber é para a cavidade oral. Nenhum dos trabalhos disponíveis na literatura consultada detectou tumor maligno fora da boca. Alguns autores⁸ acharam em necrópsia um caso de papiloma no estômago do rato, dentre 116 animais. Esse trabalho é o único entre os estudos analisados que induziu a neoplasia fora da língua quando a 4NQO foi administrada pela água.

A intoxicação foi eficiente, pois teve atuação sistêmica. Surgem, então, algumas perguntas que poderiam ser explicadas por analogia com os trabalhos semelhantes disponíveis na literatura. Por que no modelo adotado conseguiu-se induzir tumores em vários órgãos sistêmicos e o objetivo na cavidade oral não foi atingido plenamente? Será que o epitélio da língua do camundongo é mais resistente do que os outros tecidos? Será que a temperatura e o "stress" ambiente do biotério sem ar condicionado, que variou de 26° C a 33° C, influenciou o resultado?

Iniciou-se o trabalho com 61 animais e ao término do

experimento houve o óbito de 25 animais, quatro do grupo controle e 21 do grupo intoxicado pela 4NQO. Acredita-se que os óbitos do grupo controle devem ter ocorrido em consequência da alta temperatura ambiente associado ao "stress" sofrido pelos animais. No grupo intoxicado, associado ao "stress", a droga inegavelmente teve influência na morte dos camundongos. Dados semelhantes em consequência da 4NQO são descritos na literatura⁹.

Alguns autores¹⁴ demonstraram que a ação da 4NQO em linfócitos de humanos adultos não foi alterada com a temperatura, que variou no experimento de 0° C a 41° C. Nesse trabalho "in vitro" não havia os fatores humorais provenientes do "stress", como no estudo em questão. Conclui-se que a variação de temperatura não alterou o princípio ativo da droga na pesquisa.

Será que o animal escolhido neste modelo, camundongo Swiss, tem maior resistência no epitélio da língua? Haveria algum outro fator humoral envolvido na resistência tecidual? Segundo dados da literatura¹⁵, a resistência genética para a formação de câncer na língua em ratos pôde ser demonstrada. A linhagem Dark-Agouti (DA) mostrou maior suscetibilidade no gene Stc1 e a linhagem Wistar-Furth (WF) maior resistência no gene Rtc1, na formação do câncer nesse órgão. Certos autores¹⁶ demonstraram que a saliva humana inativou o efeito mutagênico da 4NQO no teste de Ames para *Salmonella typhimurium*. De acordo com eles, existem mecanismos complexos envolvendo a saliva na inativação de carcinógenos, incluindo as reações químicas de enzimas, vitaminas e/ou a adsorção destes carcinógenos em substâncias de alto peso molecular presentes na saliva, como as proteínas, bactérias e muco.

Na literatura consultada, foram encontrados somente dois trabalhos com a 4NQO em camundongos, sendo que em nenhum deles houve a aparecimento de câncer. SUZUKI et al.¹⁷ observaram mutagenicidade e a presença de micronúcleos após 7, 14 e 28 dias de intoxicação com a 4NQO em diversos epitélios. MA et al.¹⁸ realizaram uma exposição de 4NQO em camundongos por um período máximo de 4 meses. Desenvolveram displasia no epitélio da língua. Verificou-se no trabalho de SUZUKI et al.¹⁷ o primeiro estágio e no estudo de MA et al.¹⁸ o segundo estágio da carcinogênese. Nesta pesquisa, com 8 meses (aproximadamente 32 semanas) de exposição dos animais com a 4NQO, desenvolveram-se cistos nos testículos como também neoplasias mesenquimais e o câncer em diversos epitélios de diferentes sistemas, caracterizando assim o segundo (a presença de cistos, além de linfangiomas, nódulo, adenomas, hiperplasias e cistoadenomas) e o terceiro estágios da carcinogênese (neoplasias mesenquimais e adenocarcinomas). Essas evidências mostram uma certa resistência no epitélio da língua no trabalho apresentado. O fato deste experimento não ter evidenciado a lesão pré-maligna ou o tumor na língua não o descaracteriza como modelo para carcinogênese em vias aerodigestivas superiores. É de se supor no mínimo a evidência do primeiro estágio do câncer no epitélio da boca do camundongo, conforme os modelos descritos acima. Aguarda-se os recursos da imunohistoquímica para a expressão de alterações genéti-

cas, caracterizando a primeira fase da carcinogênese que certos autores¹⁷ acreditam existir.

De acordo com a literatura¹⁹, o ambiente adequado para se manter os animais é em temperatura condicionada de 18° C a 24° C, com umidade relativa do ar em 45 a 55%. Os animais foram mantidos a temperatura e ao ar ambientes, variando de 26° C a 33° C. Os ratos se adaptam à uma variação de temperatura de 10° C a 30° C, em 3 a 6 semanas¹⁹. Assim, mimetizou-se a temperatura ao qual o homem está sujeito no seu habitat no nordeste do Brasil, sofrendo todo o "stress" natural. A temperatura ideal descrita para trabalhos com condicionamento do ambiente de laboratório, não traduz realmente o meio ambiente do homem. Contudo, demonstrou-se um modelo que mais se aproxima aos efeitos dos carcinógenos no ser humano, uma vez que este não vive permanentemente em ambientes condicionados de temperatura e umidade do ar. Não foram encontrados dados na literatura para comparação modelos de carcinogênese animal em ambientes não condicionados.

Assim, diante dos fatos expostos acima, acredita-se que a primeira fase do estágio da carcinogênese exista na língua e em outros tecidos deste modelo experimental. Tal experimento sugere a afirmação do campo de cancerização, com os mutiestádios da formação do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Slaughter, DP. Southwick, HW. Smejkal, WD. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*, 1953; 6: 963-968.
2. Vrabec, DP. Multiple primary malignancies of the upper aerodigestive system. *Ann Otol*, 1979; 88: 846-854.
3. Carlson, JA. Scott, D. Wharton, J. Incidental Histology patterns: possible evidence of field cancerization surrounding skin tumor. *A Jour Dermatophol*, 2001; 23:494-496.
4. Carey, ET. Field cancerization: Are multiple primary cancers monoclonal or polyclonal? *Ann Med*, 1996; 28:183-188.
5. Sidranski, D. Molecular diagnosis and gene therapy of head and neck cancer. In: 5th International Conference on *Head and Neck*, San Francisco, California, USA, 2000. Proceedings.
6. Faber, E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res*, 1984; 44: 4217-4223.
7. Slaga, TJ. Hanausek, M. Morizot, D. et al. Importance of animal models in understanding human carcinogenesis and its chemoprevention. *The Cancer Bull*, 1995; 47: 438-444.
8. Ohne, M. Satoh, T. Yamada, S et al. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*, 1985; 59: 600-607.
9. Yamamoto, Y. Makinmoto, K. Takahashi, H. Cell kinetic study on experimental tongue carcinoma in rats. *Acta Otorinol*, 1990; 110:324-330.
10. Kitano, M. Hatano, H. Shisa, H. Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue

- carcinoma in rats. *Jpn J Cancer Res*, 1992; 83: 843-850.
11. LI, T.J. Altered placental glutathione S-transferase foci as a tumor marker during rat lingual carcinogenesis. *Chin J Dent Res*, 1999; 2:49-53.
 12. Mori, H. Kawabata, K. Yoshimi, N. et al. Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. *Anticancer Res*, 1999; 19:3775-3778.
 13. Nishimura, A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res*, 1999; 78: 1264-9.
 14. Miura, K. Morimoto, K. Koizumi, A. Effects of temperature on chemical induced sister chromatid exchange in human lymphocytes. *Mutat Res*, 1986; 174:15-21.
 15. Kitano, M. Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathol Int*, 2000; 50:353-362.
 16. Nishioka, H. Nishi, K. Kyokane, K. Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. *Mutat Res*, 1981; 85:323-333.
 17. Suzuki, T. Itoh, S. Nakajima, M. et al. Target organ time-course in the mutagenicity of five carcinogens in Muta Mouse; a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by Jems/mms. *Mutat Res*, 1999; 444:259-268.
 18. Ma, G. Sano, K. Ikeda, H. Promotional effects of CO₂ laser scalpel incision on 4NQO-induced premalignant lesions of mouse tongue. *Laser Surg Med*, 1999; 25:207 - 212.
 19. Baker, HJ. Lindsey, JR. Weisbroth, SH. Housing to control research variables. In: Baker, HJ. Lindsey, JR. Weisbroth, SH. The laboratory rat. Biology and diseases. Ed. New York, Academic Press Inc., 1979; 1:169-192.