



Sérgio Luiz Marques Madeira

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO E À INGESTÃO CRÔNICA
DE ETANOL SOBRE AS MUCOSAS DA LÍNGUA E DA FARINGE. ESTUDO
HISTOPATOLÓGICO EM RATOS.**

Orientadora: Profª. Livre-Docente Regina Helena Garcia Martins

Botucatu – SP

2010

Sérgio Luiz Marques Madeira

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO E À INGESTÃO CRÔNICA
DE ETANOL SOBRE AS MUCOSAS DA LÍNGUA E DA FARINGE. ESTUDO
HISTOPATOLÓGICO EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Livre-Docente Regina Helena Garcia Martins

Botucatu – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Madeira, Sérgio Luiz Marques.

Efeitos da exposição à fumaça de cigarro e à ingestão crônica de etanol sobre as mucosas da língua e da faringe : estudo histopatológico em ratos / Sérgio Luiz Marques Madeira. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Regina Helena Garcia Martins

CAPES: 40105008

1. Anatomia patológica. 2. Fumo – Efeito fisiológico. 3. Faringe.
4. Língua.

Palavras-chave: Álcool; Morfologia; Ratos; Tabaco; Vias aéreas.

À minha esposa, **Cleide** e aos meus filhos **Marcela e Sérgio**,
meus motivadores, pelo amor e compreensão.

À ***Professora Regina Helena Garcia Martins***, pela orientação impecável, simultaneamente doce e enérgica, porém sempre segura; proporcionando com sua conduta profissional e pessoal, os recursos do conhecimento e ética necessários para realização deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela oportunidade de realização deste mestrado;

Professora Noeme Sousa Rocha do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp) - Campus de Botucatu, pelo auxílio na realização das análises histológicas;

Alexandre Todorovic Fabro, médico patologista e doutorando do Programa de Patologia da Faculdade de Medicina (Unesp) - Campus de Botucatu, pela amizade e pela assistência na realização das análises histológicas e fotográficas da Microscopia Óptica;

Breno Souza Salgado, médico veterinário e mestrando do Programa de Patologia da Faculdade de Medicina (Unesp) - Campus de Botucatu, pela presteza na realização das análises histológicas da Microscopia Óptica;

Professora Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (Unesp), pela orientação e análise estatística dos resultados;

Professor Dr. Norimar Hernades Dias, médico do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), pelos incentivos na realização deste projeto;

Graziela de Oliveira Semenzati, médica do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp) e doutorando do programa de Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), pela amizade e companheirismo;

Karen Fernanda Alves, acadêmica da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), pela divulgação científica nos congresso de graduação deste projeto;

Marta Regina Russo Sarzi e Carlos Alberto Martins funcionários do Laboratório Experimental do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pela colaboração na execução do trabalho experimental;

Cynthia Scolastico Cecílio, secretária do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela atenção e inúmeras colaborações a mim dispensadas;

Nilse Ribeiro da Silva, funcionária do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela atenção e colaboração a mim dispensadas;

Simone Barroso Corvino Camargo, secretária do Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia, pela atenção e colaboração a mim dispensadas;

aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela atenção e colaboração a mim dispensadas;

Rosemeire Aparecida Vicente, da Seção Técnica de Referência, Atendimento ao Usuário e Documentação do Campus de Botucatu (UNESP), pela elaboração da ficha catalográfica.

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO E LITERATURA.....	1
1.1. Aspectos epidemiológicos do tabagismo, do etilismo e das neoplasias de boca e da faringe.....	1
1.2. Aspectos histopatológicos do câncer de boca e da faringe.....	12
2. OBJETIVO.....	16
3 MATERIAL E MÉTODO	18
3.1 Animais utilizados	19
3.2 Ambiente de experimentação	19
3.3 Grupos Experimentais	20
3.4 Seqüência das etapas experimentais	20
3.4.1 Preparo e administração da solução de etanol.....	20
3.4.2 Exposição à fumaça de cigarro	21
3.4.3 Procedimento do sacrifício	23
3.4.4 Estudo de Microscopia de Luz.....	24
3.5 Análise estatística	25
4. RESULTADO	26
4.1 Estudo de microscopia de luz.....	27
4.1.1 Análise histopatológica da superfície da língua.....	27
4.1.2 Análise histopatológica da superfície da faringe.....	37
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. ANEXO.....	74

Figura 1	Metodologia de oferta de líquidos e ração aos animais do experimento. Em a e em b, detalhes das conexões dos frascos de oferta de líquidos e de ração.	21
Figura 2	Aparelho de fumar: em a, detalhes do local de adaptação dos cigarros; em b, detalhes da conexão do aparelho de fumar à câmara onde estão os animais expostos à fumaça.	22
Figura 3	Detalhes da metodologia da experimentação para exposição dos animais à inalação da fumaça de cigarro. Do lado esquerdo da figura está posicionada a máquina de fumar e do lado direito a câmara contendo os animais	22
Figura 4	Metodologia cirúrgica utilizada para remoção da peça histológica. Em a, exposição cervical após fratura mandibular parasinfisária bilateral para remoção do segmento de língua faringe e laringe em bloco; em b, segmento da via aérea após a remoção e pontos de biópsia em língua (L) e faringe (F).	23
Figura 5	Superfície dorsal da língua de ratos do grupo controle recoberta pelas papilas filiformes, sustentadas por uma membrana basal, disposta sobre delicada faixa de tecido conjuntivo adjacente à musculatura. Microscopia de luz, H&E, 40X.	30
Figura 6	Superfície da língua de ratos do grupo controle recoberta por papilas filiformes, células basais alinhadas e uniformes (a, b, c, setas estreitas); células adjacentes com citoplasma mais volumoso (a,b,c, setas interrompidas). Presença de grânulos hipercrômicos na superfície distal do epitélio (a,b,c, setas largas). Microscopia de Luz, H&E, a (60X), b (80X), c (80X).	31

Figura 7	Superfícies de línguas de ratos de G-II, sendo evidenciado detalhe da extremidade da papila filiforme recoberta por uma camada ceratótica (setas).Microscopia de Luz, H&E,40X	32
Figura 8	Superfície de língua de ratos de G-II com hiperplasia de células epiteliais (setas contínuas) e figuras de mitose (seta pontilhada). Microscopia de luz,H&E, a (60X), b (40X).	32
Figura 9	Superfície de língua de rato de G-II com áreas focais de displasia leve (setas). Microscopia de Luz, H&E, 80X.	33
Figura 10	Superfícies de línguas de ratos de G-II com células apoptóticas (setas). Microscopia de Luz, H&E, 60X (a e b).	33
Figura 11	Superfície de língua de ratos de G-IV com displasia focal moderada (setas). Microscopia de Luz, H&E, a (40X), b (80X).	34
Figura 12	Superfície de língua de rato de G-IV com área de displasia moderada (seta); células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz, H&E, (80X).	34
Figura 13	Superfície de língua de rato de G-IV com áreas focais de displasia intensa (setas contínuas) e células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz,H&E, 80X.	35
Figura 14	Superfície de língua de rato de G-II com áreas de displasia intensa (setas contínuas) e células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz, H&E, 60X.	36

Figura 15	Epitélio de cobertura da região da faringe de rato de G-I; nota-se que o epitélio pluriestratificado repousa sobre uma membrana basal delicada abaixo da qual se distribui uma delicada rede de fibras colágenas e agrupamentos glandulares. Microscopia de Luz, H&E, 60X.	39
Figura 16	Superfície de faringe de rato de G-I com epitélio pavimentoso estratificado. Detalhes da distribuição e do formato das células epiteliais e da delicada camada hiperqueratizada. Microscopia de Luz, H&E, 80X.	40
Figura 17	Superfície de faringe de rato de G-III com hiperqueratose epitelial intensa e vasodilatação na lâmina própria. Microscopia de Luz, H&E, 60X.	40
Figura 18	Superfície de faringe de rato de G-III com área de displasia leve. Microscopia de Luz, H&E, 60X.	41
Figura 19	Superfície de faringe de rato de G-IV com displasia epitelial moderada. Microscopia de Luz, H&E, 60X.	41
Figura 20	Superfície de faringe de rato de G-III com displasia intensa focal (seta). Microscopia de Luz, H&E, 60X.	42
Figura 21	Superfície de faringe de rato de G-III com displasia intensa focal (seta). Microscopia de Luz, H&E, 80X.	42

Tabela 1	Análise histológica das biópsias de língua em cada grupo de estudo.	29
-----------------	--	-----------

Tabela 2	Análise histológica das biópsias de faringe em cada grupo de estudo.	38
-----------------	---	-----------

Lista de abreviaturas

ALDH	Aldeído Desidrogenase
CEC	Carcinoma Espinocelular
DAB	Departamento de Atenção Básica
GST	Genes Supressores de Tumores
g	Grama
oC	grau Celsius
H&E	Hematoxilina-Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MS	Ministério da Saúde
p	nível de significância
NNN	N-Nitrosornicotina
OMS	Organização Mundial de Saúde

INTRODUÇÃO: O cigarro e o álcool contêm em suas composições substâncias tóxicas e carcinogênicas que se potencializam com a associação dos hábitos. O câncer da cabeça e pescoço contribui com 4 a 5 % do total de neoplasias malignas do organismo, das quais 30 a 40% situam-se na boca, 25% na laringe e 15% na faringe. Os homens são os mais afetados e o tipo histológico predominante é o carcinoma espinocelular, podendo ser precedido de lesões pré-neoplásicas. Pesquisas experimentais permitem a exposição de cada fator agressor separadamente, possibilitando avaliar os efeitos nocivos de cada um ou de sua associação. **OBJETIVO:** Estudar, em ratos, os efeitos da exposição crônica à fumaça de cigarro e à ingestão de etanol sobre as mucosas da língua e da faringe, por meio de análise histopatológica. **MATERIAL E MÉTODO:** Foram alojados em gaiolas durante 260 dias 40 ratos adultos *Wistar* subdivididos em quatro grupos de 10 animais: **GI (Controle)**, ração e água *ad libitum*; **GII (Etilismo)**, submetidos à ingestão de etanol a 30°GL diluído em água destilada e ração *ad libitum*; **GIII (Tabagismo)** expostos à inalação de fumaça de 10 cigarros/dia, sete dias/semana durante 30 min. em câmara fechada contendo “aparelho de fumar”; **GIV (Etilismo e Tabagismo)** submetidos à ingestão de etanol a 30°GL e à inalação de fumaça de cigarro, ração e água *ad libitum*. Após 260 dias os animais foram sacrificados, sendo removido em bloco o segmento de língua e faringe. Biopsias foram realizadas nesses sítios e fixadas em formalina 10% para estudo histopatológico. Nas análises deste utilizou-se escore semi-quantitativo de 0 a 3. **RESULTADO:** Nas biópsias de língua, apenas dois animais de GI (controle) apresentaram aumento de número de vasos na lâmina própria. Nos animais de GII (Etilismo), GIII (Tabagismo), ou GIV (Etilismo e Tabagismo) os parâmetros mais pontuados foram: hiperplasia de células apicais (GII-60%, GIII-30%,GIV-20%) e basais (GII-60%, GIII-40%), hiperkeratose (GII-70%,

GIII-30%,GIV-30%), displasia (GII-60%, GIII-60%,GIV-50%), apoptose (GII, 60%; GIII-40%; GIV-60%), entre outras. Displasia grave em língua foi detectada em alguns animais dos grupos GII e GIV, caracterizando o carcinoma *in situ*. Em faringe, GI (controle) apresentou os menores escores. Os parâmetros mais alterados nos demais grupos foram: hiperplasia de células apicais (GII-40%, GIII-30%,GIV-70%) e basais (GII-30%, GIII-40%; GIV-40%), hiperkeratose (GII-50%, GIII-80%,GIV-40%); displasia (GII-50%, GIII-80%,GIV-50%). Em um animal do grupo III (tabagismo) foi observada em faringe displasia de grau intenso ou carcinoma *in situ*. **CONCLUSÃO:** Nas condições experimentais deste estudo, a ingestão crônica de etanol e a exposição à fumaça de cigarro de ratos durante 260 dias determinaram lesões importantes em língua e faringe, desde eventos benignos como hiperplasias epiteliais, hiperkeratose e inflamação, até alterações mais relevantes como displasias de diversos graus, incluído o carcinoma *in situ*. Esses resultados confirmam os efeitos deletéricos do álcool e do tabaco sobre as mucosas da língua e da faringe.

Palavras-chave: Álcool; Morfologia; Ratos; Tabaco; Vias aéreas.

INTRODUCTION: Cigarettes and alcohol contain toxic and carcinogenic substances whose effect is potentiated when cigarette smoking and alcohol drinking are associated. Head and neck cancers account for 4-5 % of all malignant tumors, and are located in the mouth, larynx and pharynx in 30-40%, 25%, and 15% of the cases, respectively. Males are the most affected, and spinocellular carcinoma is the most common histological type that may be preceded by preneoplastic lesions. Experimental studies allow evaluating the adverse effects of exposure to different aggression agents both separately and in association. **OBJETIVE:** To study in rats, the effects of chronic exposure to cigarette smoke and the ingestion of ethanol on the mucosa of the tongue and pharynx by means of histopathology. **MATERIAL AND METHODS:** Forty adult *Wistar* rats, kept in cages for 260 days, were allocated into four groups of 10 animals each: GI (Control), fed chow and water “ad libitum”; GII (Alcohol drinking), submitted to the ingestion of 30gl ethanol diluted in distilled water, and receiving chow “ad libitum”; GIII (Smoking) exposed to the smoke of 10 cigarettes/day, seven days/week for 30 min. in a closed chamber housing a “smoking machine”; G4 (Alcohol drinking and smoking) submitted to the ingestion of 30gl ethanol and cigarette smoke exposure, receiving food and water “ad libitum”. After 260 days, the animals were sacrificed, and the tongue/pharynx segment was removed by block dissection. Biopsy specimens were fixed in 10% formalin for histopathological analysis using a 0-3 semiquantitative score system. **RESULTS:** Tongue biopsies showed an increased number of vessels in the lamina propria in only two GI (control) animals. In GII (Alcohol drinking), GIII (Smoking), or GIV (Alcohol drinking and smoking) the parameters receiving the highest scores were: apical cell hyperplasia (GII-60%, GIII-30%,GIV-20%) and basal cell hyperplasia (GII-60%, GIII-40%), hyperkeratosis (GII-70%, GIII-30%,GIV-30%), dysplasia (GII-60%,

GIII-60%,GIV-50%), and apoptosis (GII, 60%; GIII-40%; GIV-60%), among others. Severe tongue dysplasia was detected in some animals in GII and GIV, characterizing in situ carcinoma. Pharynx biopsies revealed that GI (control) had the lowest scores. In the remaining groups, the most altered parameters included apical cell hyperplasia (GII-40%, GIII-30%,GIV-70%) and basal cell hyperplasia (GII-30%, GIII-40%; GIV-40%), hyperkeratosis (GII-50%, GIII-80%,GIV-40%; and dysplasia (GII-50%, GIII-80%,GIV-50%). Severe dysplasia or in situ carcinoma in the pharynx was observed in one animal from group III (smoking). **CONCLUSIONS:** Under the experimental conditions of this study, chronic ethanol ingestion and cigarette smoke exposure for 260 days in rats led to significant tongue and pharyngeal lesions, which ranged from benign events such as epithelial hyperplasia, hyperkeratosis and inflammation, to more relevant alterations such as dysplasia of varying degrees, including in situ carcinoma. These findings confirm the deleterious effects of alcohol and tobacco on the tongue and pharyngeal mucosa.

Key words - rats, airways, histology, alcohol, tobacco.

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do tabagismo, do etilismo e das neoplasias de boca e da faringe

A prevalência de tabagismo no Brasil foi investigada em 2004 pelo Ministério da Saúde através do Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 16 capitais, por meio de um inquérito epidemiológico que entrevistou 23.457 indivíduos, sendo 10.175 do gênero masculino e 13.282 do sexo feminino. A prevalência de tabagismo encontrada variou de 12,9% a 25,2% (em homens: de 16,9% a 28,2%; em mulheres: de 10,0% a 22,9%). (Brasil, 2004a) Esses índices são bastante preocupantes, porém inferiores aos apontados em inquéritos anteriores, como o de 1998, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) cuja prevalência de tabagismo foi de 39,3% para os homens e de 25,2% para as mulheres. (IBGE, 1998). O hábito de fumar foi mais freqüente entre os homens, numa proporção de 2:1, porém nas regiões Sudeste e Sul tal proporção aproximou-se da unidade. O hábito mostrou-se mais freqüente entre os adultos, porém nas regiões mais urbanizadas foi também freqüente entre jovens de 15 a 24 anos, e disseminado, especialmente entre os indivíduos com menor escolaridade, e conseqüentemente, de menor renda. O tabagismo foi também detectado em elevada porcentagem de adolescentes de 13 a 15 anos, especialmente nas regiões de Porto Alegre (48,3%) e Curitiba (46,3%). Um dado promissor em nosso país foi o elevado índice de cessação de uso de tabaco, em torno de 50% em todas as capitais pesquisadas, índice superior ao de outros países, como por exemplo, dos EUA que é de 40%. O inquérito também apontou uma elevação na taxa de mortalidade para o câncer de pulmão nas mulheres, em todas as regiões do país, o que pode estar associado ao

aumento da prevalência do tabagismo nesse gênero, diferentemente do que vem sendo observado entre os homens, que apresentam tendências estáveis ou mesmo de queda a partir da metade da década de 90 (Brasil, 2004b).

Procurando delinear também um retrato preciso da população brasileira em relação aos padrões do consumo de álcool, o Governo do Estado de São Paulo encomendou em 2007, o I Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira. Neste inquérito foram investigadas 3.007 pessoas, sendo 2.346 adultos e 661 adolescentes. O inquérito apontou que 48% da população são abstinentes, 24% bebem freqüentemente ou pesado e 29% são bebedouros pouco freqüentes ou inconstantes. Ou seja, metade dos indivíduos consome álcool a níveis prejudiciais à saúde. O hábito mostrou-se mais freqüente entre os homens (39%), e mais prevalente na população da região Sul; entretanto, nesta o número de doses é menor, quando comparado às regiões Centro-Oeste e Norte. Na população acima de 60 anos o hábito é menos freqüente (15%), quando comparado à população mais jovem (30%); é 30 vezes mais freqüente na população de classe social mais rica, porém nestes o número de doses é menor quando comparado à população de menor renda. O início do consumo começa cedo, logo na adolescência, por volta de 13,9 anos, sem haver predomínio de gênero (Brasil, 2007).

No passado, o tabaco foi originalmente processado a partir das espécies vegetais da *Nicotiana tabacum* e da *nicotiana rustica*. Povos europeus observaram a utilização do tabaco pelos nativos, que nesse período já possuíam o hábito de fumar e o utilizavam também como terapia medicinal, sendo responsáveis pela sua propagação na sociedade da época (Figlie *et al.*, 2004).

A nicotina, amina terciária volátil, teve seu nome atribuído em homenagem ao embaixador Jean Nicot, que em 1561, estudou as propriedades

medicinais da planta. Sua síntese ocorreu primeiramente em 1890, sendo o tabaco consumido sob a forma de cachimbos. Por volta de 1850, na Inglaterra, popularizou-se a comercialização dos cigarros manufaturados. Somente em 1998, através de um relatório divulgado pelo Ministério da Saúde dos Estados Unidos, comprovou-se a capacidade do tabaco em causar dependência química, sendo em 1997 o uso do tabaco rotulado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como responsável por transtorno comportamental. (Musk & de Klerk, 2003; Routh *et al.*, 1998).

O cigarro e o álcool contêm em suas composições substâncias tóxicas e carcinogênicas. A fumaça do cigarro contém mais de 4.700 substâncias nocivas ao organismo em sua fase gasosa ou particulada. Dentre os principais componentes destacam-se: benzeno, amônia, acetona, tolueno, acetaldeído, acroleína, alcatrão, nicotina, monóxido de carbono, fenol, ácido fórmico, ácido acético, chumbo, cádmio, zinco, níquel, hidrocarbonetos policíclicos, aminas aromáticas e nitrosaminas (Fant *et al.* 1998). O monóxido de carbono e o alcatrão são responsáveis pela diminuição da oxigenação nos órgãos e pelo efeito carcinogênico, respectivamente. (Hukkanen *et al.*, 2005; Tutka *et al.*, 2005)

O álcool também possui uma série de componentes prejudiciais à saúde como nitrosaminas (agente cancerígeno), presentes em algumas cervejas e no *chopp*, micotoxinas (presente em vinhos e cervejas de milho), tanino (presente nos vinhos), arsênio inorgânico, aldeídos, pesticidas residuais e produtos da filtração de asbestos, conservantes, aromatizantes, aldeídos, acromeleinas, fenóis e cetonas (Walker *et al.*, 1979; Blot, 1992,).

O número previsto de casos de câncer por ano, a nível mundial é de aproximadamente 10,5 milhões, sendo que os tumores da boca e faringe ocupam a terceira posição nos países pouco desenvolvidos, e a oitava nos desenvolvidos (Spitz,

1994; Lopes *et al.*, 2008). As estatísticas de casos novos de câncer nos Estados Unidos em 2001 apontaram 1.268.000 casos, sendo a cavidade oral responsável por 30.100 deles (2,37%), distribuídos entre língua (7.100), boca (10.5000), faringe (8.400), outros sítios (4.100) (Greenlee *et al.*, 2001). No Brasil, as previsões delineadas pelo INCA para 2008 contemplavam o surgimento de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos, sendo que metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorreram nos países de médio e baixo desenvolvimento (INCA, 2009). O número de óbitos por câncer totalizou 7,4 milhões no mundo em 2004, correspondendo a cerca de 13% do total de mortes. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, segundo o INCA (2009), válidas também para o ano de 2011, são de 489.270 casos novos de câncer, distribuídos similarmente entre os gêneros.

O câncer da cabeça e pescoço engloba as regiões da cavidade oral, faringe e laringe, e contribui com 4 a 5 % do total de neoplasias malignas do organismo. A cavidade oral é considerada sítio prevalente dos tumores da região de cabeça e pescoço, sendo responsável por 30% a 40% dos casos. A região da faringe contribui com 15%, a laringe com 25% e o restante localiza-se nos sítios remanescentes, incluindo nasofaringe e glândulas salivares (Greenlee *et al.*, 2001; Ruíz *et al.*, 2006; Alvarenga *et al.*, 2008). Alvarenga *et al.*(2008), em análise retrospectiva de 427 prontuários médicos de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço constataram entre as principais características epidemiológicas: predomínio do gênero masculino (86%), cor branca (90%), hábito de tabagismo e de etilismo, em 83,37% e 65,80% dos casos, respectivamente, idade média de 61 anos, predomínio das atividades rurais entre os homens (24,25%) e das domésticas entre as mulheres (60%). O câncer da cavidade oral foi o mais prevalente, detectado em 35,37% dos casos, seguido do câncer da laringe (31,15%), da orofaringe (16,15%), da hipofaringe (8,43%) e da nasofaringe (1,88%).

O predomínio das neoplasias na cavidade oral foi salientado por Pithan *et al.*, (2004), em análise retrospectiva dos prontuários médicos de 400 pacientes portadores de câncer de boca atendidos em um hospital de referência da região Sul do estado de São Paulo, constatando entre os sítios mais acometidos, a língua (19,75%), o palato mole (16,25%), o assoalho de boca (12,75) e o rebordo alveolar (12,75%). Resultados semelhantes foram observados por Oliveira *et al* (2006), analisando uma casuística de 340 pacientes portadores de carcinoma espinocelular bucal, sendo 84,4% do gênero masculino, havendo predomínio da faixa etária entre 51 a 60 anos (31,80%). Os autores observaram que a língua e o assoalho bucal foram os locais mais afetados pelas neoplasias malignas de cavidade oral, totalizando juntos 55% dos casos. Estes sítios também foram os mais prevalentes na casuística estudada, recentemente, por Teixeira *et al.*(2009) a qual incluiu 225 pacientes com câncer bucal atendidos em um hospital de referência de Fortaleza, correspondendo a 21,7% dos casos no assoalho de boca e 22,8% na região da língua.

Os dados epidemiológicos levantados por Zini *et al* (2010), relativos ao carcinoma bucal em quatro décadas, correspondendo ao período entre 1970 a 2006, mostraram predomínio de pacientes com idade acima de 55 anos, sendo a borda lateral da língua e a gengiva, sítios freqüentemente acometidos em mulheres. Os carcinomas nesses sítios apresentavam as piores taxas de sobrevida quando comparadas aos de lábio. Sarcomas e linfomas foram os tumores mais freqüentes em pacientes com idade abaixo de 20 anos.

Carcinomas de língua afetam preferencialmente pacientes com idades mais avançadas, porém os mesmos têm sido diagnosticados também em pacientes mais jovens, uma vez que o tabagismo e o alcoolismo são iniciados cada vez mais

precocemente, muitas vezes logo na adolescência. Siegelmann-Danieli *et al.*(1998), estudando os tumores de língua em 87 pacientes, observaram que 30 deles possuíam idade inferior ou igual a 45 anos, e os 57 restantes, maior ou igual a 46 anos, havendo predomínio do gênero masculino; a exposição prévia ao tabaco e/ou álcool foi observada em 40% do grupo de pacientes jovens e em 82% dos mais velhos. Interessados também em estudar o comportamento do câncer de língua em indivíduos mais jovens, Mathew *et al.*(2001) avaliaram 115 pacientes com carcinoma espinocelular de língua (CEC) com idade inferior a 35 anos (idade média de 30,5 anos), constatando predomínio do gênero masculino (1,7:1) e antecedentes de tabagismo e etilismo em 50,5% dos casos. Lesões em graus mais avançados foram identificadas por esses autores em 70 pacientes (60,9%), dos quais 51,3% já apresentavam comprometimento de linfonodos regionais. Os autores constataram ainda similaridade na sobrevida entre pacientes jovens e idosos com tumores de língua, contrariando os achados de outros autores (Martin-Granizo *et al.*,1997; Davidson *et al.*,2001; Sarini *et al.*,2001; Oliveira *et al.*,2006).

A partir da década de 60, a incorporação das mulheres ao mercado de trabalho determinou mudanças de seus hábitos sociais, universalização dos fatores de risco e modificação do perfil epidemiológico das neoplasias, culminando com aumento notável de novos casos de câncer do trato aereodigestivo entre elas (Borrel *et al.*, 1990; Parkin *et al.*, 2005). Carvalho *et al.*(2001) estudando as principais características clínico-epidemiológicas do CEC de cavidade oral entre os gêneros analisaram, retrospectivamente, os prontuários dos pacientes atendidos em um setor de oncologia, incluindo 228 mulheres e 849 homens. A média de idade das mulheres foi discretamente menor que a dos homens (55,6 e 60,7 anos, respectivamente). À semelhança do sexo masculino, os dois principais sítios de incidência dos tumores nas mulheres foram a

língua e assoalho de boca. Em estudo semelhante, Perussi *et al.* (2002) analisaram, retrospectivamente, os prontuários médicos de 1.440 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca, sendo que 562 possuíam idade acima de 60 anos e 878 abaixo dessa. Constataram predomínio do gênero masculino sobre o feminino em pacientes com idade inferior a 60 anos (8:1) e proporção menor entre os gêneros nos pacientes com mais de 60 (3:1). Nesta última população, os sítios predominantes da lesão foram as regiões jugal (56%) e palatal (47%); já nos pacientes com menos de 60 anos, as regiões mais acometidas foram o assoalho de boca (67%) e a língua (62%).

Amorim *et al.*(2003) avaliaram as características clínicas de 31 mulheres portadoras de CEC da base da língua e constataram predomínio de caucasianas (58,1%) e da sexta década de vida; com relação à profissão, a maioria realizava trabalhos domésticos (83,9%). O hábito isolado do tabagismo foi reportado por 48,4% e sua associação com o etilismo por 45,2% da população estudada. Os sintomas e sinais que mais se destacaram foram dor e dificuldade para engolir (48,4%), nódulo no pescoço (19,3%), otalgia (9,7%), ferida na língua (6,4%) e alteração na voz (3,2%).

O câncer bucal é neoplasia multifatorial, determinada por fatores genéticos e ambientais, destacando-se entre estes últimos o tabagismo e o alcoolismo, como exposto nas pesquisas acima relacionadas. Toda a cavidade oral pode ser sede de lesões, porém a língua ganha destaque, sendo que as regiões mais posteriores desta apresentam pior prognóstico, provavelmente pela disseminação linfonodal mais precoce. O baixo percentual de sobrevida para pacientes com tumores de base de língua, sugere a existência de um comportamento mais agressivo nessa localização, quando comparada às regiões mais anteriores. Nason *et al.*(1996) avaliaram 300 pacientes com carcinoma espinocelular de língua, sendo que 112 apresentavam lesões na base da língua e 188 nas regiões mais anteriores. Os pacientes com lesões na região posterior

que se encontravam em estágio avançado da doença (estádio III e IV) corresponderam a 71% dos casos, contra 32% daqueles com tumores localizados nas porções mais anteriores. No *follow up* de cinco anos desses pacientes, a sobrevida para os portadores de tumor em base de língua foi de 26%, contra 64% dos portadores de lesões mais anteriores.

Lewin *et al.*(1998), em estudo epidemiológico que incluiu 605 pacientes de 40 a 79 anos portadores de câncer oral atendidos na Suécia entre 1988–1990 constataram risco relativo de 6,5% para o desenvolvimento de carcinoma de cabeça e pescoço entre os que eram tabagistas. O risco relativo associado ao consumo de 50 gramas ou mais de álcool por dia, em comparação com os consumidores de 10 gramas por dia foi de 5,5%. Efeito sinérgico e exponencial foi observado nos pacientes com associação de ambos os vícios.

Em extensa revisão de literatura que incluiu diversas pesquisas realizadas entre 1988 a 2009, em diferentes centros e populações, Goldstein *et al.*(2010) investigaram os fatores de risco para o câncer oral e da faringe, constatando fortes evidências do consumo excessivo do álcool com o aumento do número de câncer, tanto em cavidade oral como na faringe, correspondendo a um risco relativo de 3,2 a 9,2 para consumidores de mais de 60 g/dia (ou mais de quatro doses ao dia). A associação com o tempo do uso do álcool não pode ser determinada nesse estudo.

A ação nociva do álcool e do tabaco pode ser identificada ao longo de todo o trato aéreo e digestivo, porém parece ser mais pronunciada nas proximidades do local da exposição, tornando a cavidade oral e a faringe, sítios vulneráveis às lesões. As características clínicas e epidemiológicas observadas por Berto *et al.*(2006), em estudo de 507 pacientes com CEC de faringe, não diferiram dos trabalhos de câncer de boca apresentados acima, havendo também predomínio do gênero masculino, da raça branca,

idade média de 56,5 anos, e relato de tabagismo e de etilismo pela maioria dos pacientes. Entre os sintomas mais referidos destacaram-se ferida na garganta (13,6%), caroço no pescoço (11,8%) e rouquidão (7,9%). Os autores constataram que a maioria dos pacientes portadores de carcinoma em faringe procurava os serviços de assistência à saúde tardiamente, com tumores em estágio avançado.

Quando comparados aos cigarros, os charutos e cachimbos apresentam maior teor de nicotina, particularmente os primeiros, devido à sua maior concentração de tabaco. As folhas de tabaco destinadas para charutos e cachimbos passam por processos de envelhecimento e fermentação seqüenciais, o que confere à sua fumaça maior alcalinidade, sendo, a nicotina facilmente liberada e prontamente absorvida pela mucosa oral. A menor porosidade e a ausência de filtro nos charutos resultam em maior concentração de substâncias, notadamente amônia, monóxido de carbono e nitrosaminas cancerígenas (Fant & Henningfield, 1988).

O risco relativo de desenvolvimento de câncer em indivíduos que fumam cigarros industrializados, cachimbos e cigarros de palha é de 6.3, 13.9 e 7.0, respectivamente quando comparados aos não fumantes (Franco *et al.*,1989). Os consumidores de mais de seis doses diárias de bebidas com elevados teores de álcool, em especial as destiladas, apresentam probabilidade 10 vezes maior de desenvolverem carcinoma quando comparados aos indivíduos sem o hábito (Graham *et al.*,1977).

Fernandes *et al.*(2007) investigaram a prevalência das lesões pré-neoplásicas bucais em 277 indivíduos etilistas com idade média de 38,4 anos, com ou sem vícios associados. Destes, 17 (6,1%) eram usuários exclusivamente de álcool, 179 (64,6%) usavam álcool e cigarro, e 81 (29,2%) consumiam álcool e outras drogas ilícitas. Por meio de exames clínicos intra-orais os autores constataram diversas lesões, entre elas queilite actínica (1,8%), leucoplasia (1,08%), eritroplasia (0,72%) e líquen

plano (0,36%). Os autores alertam os profissionais para a importância do exame minucioso da mucosa bucal para a detecção de lesões pré-neoplásicas nessa classe de pacientes.

No câncer de boca e da faringe, a associação do tabagismo com o etilismo é a condição mais frequente, o que dificulta a análise da participação carcinogênica de cada agente isoladamente (Brunin *et al.*, 1999; Fardin *et al.*, 2004; Freita *et al.*, 2005, Guerra *et al.*, 2005; Hashibe *et al.*, 2007; Marur e Forastiere, 2008). Estima-se, que dos pacientes que apresentam câncer bucal, 95% sejam fumantes e que 76% sejam também etilistas (INCA, 2009).

Frente à elevada incidência do câncer bucal, é lamentável que, apenas há seis anos, esta neoplasia tenha sido incluída no *rol* de responsabilidades da Coordenação Nacional de Saúde Bucal (Brasil.MS.DAB, 2004). As campanhas educativas e preventivas de câncer de boca, realizadas nos últimos anos por vários serviços de saúde, têm mobilizado médicos e odontólogos para essa missão. O câncer bucal é, em geral, de fácil acesso ao exame clínico, porém, por motivos diversos, que envolvem negligência do paciente e falta de atenção dos profissionais em saúde, mais de 80% de diagnósticos são tardios, culminando em grande número de óbitos e mutilações cirúrgicas (Antunes *et al.*, 2001). O diagnóstico precoce do câncer de boca é a base para o prognóstico favorável. Outra importante medida preventiva sancionada recentemente pelo governo do estado, na Assembleia Legislativa de São Paulo, foi a lei antifumo (Lei antifumo, 2009) a qual bane o uso de cigarro e derivados de tabaco em ambientes de uso coletivos (públicos e privados), favorecendo aqueles que não optaram pelo vício e que se tornaram fumantes passivos.

Tabagismo passivo consiste na exposição secundária à fumaça de produtos derivados do tabaco. Fatores como número de fumantes ativos, dimensão do espaço físico, intensidade do fumo e tempo de exposição, determinam a quantidade de nicotina a qual o indivíduo é submetido. Estudos indicam que o tabagismo passivo está associado também ao risco de desenvolvimento de doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, doenças cardiovasculares, câncer de pulmão e doenças infantis, como otite e bronquite (Okoli *et al.*,2007).

Indubitavelmente, o tabagismo e o etilismo disparam entre os fatores etiológicos do câncer de boca e da faringe; no entanto, outros fatores são também considerados de risco para o desenvolvimento das neoplasias nesses sítios, como a ação irritativa dos traumatismos crônicos provocados por próteses odontológicas totais ou parciais mal adaptadas, originando hiperplasias inflamatórias fibro-epiteliais e graus variados de displasias (Coelho & Zucoloto,1998; Brunetti & Montenegro,2002), inalação de pesticidas (Stoppelli & Crestana, 2005; Oliveira *et al.*,2008,), fatores dietéticos, agentes virais e predisposição genética.

1.2 Aspectos histológicos do câncer de boca e da faringe

O tipo histológico predominante do câncer das vias aéreas superiores é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC), correspondendo à sexta neoplasia mais comum no mundo, e a mais freqüente entre os carcinomas da cabeça e pescoço (95% dos casos) (Lentsch & Myer, 2010). O CEC surge do epitélio de superfície e é caracterizado por ilhas e/ou cordões invasivos de células epiteliais malignas. A forma clínica mais freqüente manifesta-se como uma lesão ulcerada, de bordas elevadas e

endurecidas, com fundo necrótico e granuloso, que não cicatriza em um período de duas semanas, ocasião em que os sintomas digestivos começam a ser mais expressivos (Neville *et al.*, 1998).

Pesquisas experimentais vêm sendo realizadas há várias décadas procurando reproduzir modelos de carcinogênese animal em cavidade oral, utilizando-se diversos agentes oncogênicos. Em 1994, Navarro *et al.*, estudando efeito nocivo do óxido de nitroquinolina a 0,5% (4NQO) no palato de ratos, constataram, após 2 a 3 meses de exposição, hiperkeratose, disqueratose e acantose nas estruturas expostas ao agente, além de carcinoma bem diferenciado em língua em 37,5% dos animais. Recentemente, Minicucci *et al.* (2010), em trabalho experimental em ratos, utilizando esse mesmo agente carcinogênico, demonstraram aumento da expressão da proteína p53 em fragmentos de mucosa de língua de animais expostos por 12 a 20 semanas, além de lesões pré-neoplásicas. Embora essas pesquisas tenham utilizado modelos experimentais de carcinogênese já consagrados, sabe-se que os principais agentes oncogênicos das mucosas respiratórias e digestivas estão relacionados ao tabagismo e ao etilismo, sendo importante o estudo das lesões provocadas por esses agentes nos modelos experimentais.

O conhecimento das características do epitélio normal e do patológico, exposto aos agentes agressores, é de fundamental importância no diagnóstico das lesões pré-neoplásicas, destacando-se entre elas as displasias. Na identificação destas últimas, Banoczy & Csiba (1976) destacaram os seguintes parâmetros histológicos: estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, processos reticulares em forma de gota, aumento do número de figuras mitóticas, perda da polaridade das células basais, aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear, hiperchromatismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, ceratinização de células isoladas ou em

grupos na camada celular espinhosa e redução da aderência das junções intercelulares. A displasia é caracterizada como leve, quando forem identificadas duas características citadas acima; moderada, na presença de duas a quatro; severa na presença de cinco ou mais.

A displasia epitelial representa, em termos evolutivos, quadro intermediário entre a hiperkeratose sem displasia e o carcinoma *in situ* ou carcinoma micro invasivo (Stricker & Kumar, 2010). Van der Waal *et al.*(1977) salientaram que apesar da displasia epitelial ser considerada importante fator preditivo de transformação maligna, nem todas as lesões com esta característica sofrerão esse processo e, inversamente, nem todas as lesões com ausência de displasia epitelial estarão livres de malignização. No carcinoma *in situ* toda a espessura do epitélio apresenta as alterações celulares citadas acima, porém não há invasão do tecido conjuntivo subjacente; já no carcinoma invasivo, as células comprometidas apresentam-se arranjadas em ninhos ou cordões, havendo invasão do tecido conjuntivo vizinho (Banoczy & Csiba, 1976).

Nos tumores de cabeça e pescoço, o etilismo e o tabagismo estão normalmente associados, dificultando a avaliação do caráter oncogênico de cada agente isoladamente. Os três possíveis mecanismos de ação desses dois agentes são: efeito aditivo, onde os efeitos isolados de cada agente são adicionados uns aos outros independentemente; efeito exponencial, no qual os efeitos são multiplicados; efeito sinérgico, no qual a ação conjunta de cada um é superior à isolada. O álcool é potente vasodilatador e o aumento da permeabilidade da mucosa facilita, possivelmente, a penetração dos agentes carcinógenos dos derivados do tabaco para o interior da célula, o que induz a lesões no DNA e mutações celulares. O acetaldeído, um dos principais metabólitos do etanol, atua como promotor tumoral, causando lesões hepáticas prejudicando o metabolismo de certos agentes e ativando enzimas pro - carcinogênicas;

causa ainda atrofia de mucosa e diminuição da produção salivar, diminuindo as defesas epiteliais (Figuro-Ruiz *et al.*, 2004; Gigliotti *et al.*, 2008). Boffeta & Hashibe (2006), destacam, na fisiopatologia dos mecanismos carcinogênicos do álcool, o efeito genotóxico do acetaldeído, o aumento da concentração do estrógeno, o papel solvente para as substâncias carcinogênicas do tabaco, a produção de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio e alterações no metabolismo do folato.

Os estudos experimentais ganham importância por permitirem a dissociação dos agentes agressores, possibilitando a análise histopatológica das lesões causadas por cada agente isoladamente, bem como pela associação de ambos, justificando a realização desta pesquisa.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Estudar, em ratos, os efeitos da exposição crônica à fumaça de cigarro e à ingestão de etanol sobre as mucosas da língua e da faringe por meio de análise histopatológica.

3 MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais utilizados

O projeto de pesquisa foi inicialmente apreciado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP recebendo aprovação pelo protocolo de número 698/2008 (ANEXO -A). Em seguida teve início com a seleção de 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 180-200 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista.

3.2 Ambiente de experimentação

A pesquisa foi realizada no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, local em que os animais foram mantidos durante todo o período do experimento, em sala fechada, à temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlada por ar condicionado, umidade de $60 \pm 5\%$ e período claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas de poliuretano, com, no máximo, cinco em cada gaiola, recebendo ração comercial padrão (Purina®, Brasil) e água *ad libitum* durante um período de aclimatação de sete dias antes do início do experimento. As condições de higiene das gaiolas foram garantidas por meio de limpeza diária das mesmas e remoção das excretas.

3.3 Grupos Experimentais

Após o período de aclimatação no Biotério de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, os animais foram distribuídos, por sorteio, segundo a tabela dos números casuais, em grupos como se segue:

Grupo I - Controle: 10 ratos que receberam ração e água *ad libitum* por um período de 260 dias.

Grupo II - Etilismo: 10 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30°GL com água destilada, e ração *ad libitum*, por um período de 260 dias.

Gr III - Tabagismo: 10 ratos expostos à inalação de fumaça de 10 cigarros/ dia, durante sete dias por semana, ração e água *ad libitum*, por um período de 260 dias.

Grupo IV - Etilismo e Tabagismo: 10 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30%, com água destilada, exposição à inalação de fumaça de 10 cigarros/dia, durante sete dias por semana e ração *ad libitum* por um período de 260 dias.

3.4 Seqüência das etapas experimentais

3.4.1 Preparo e administração da solução de etanol

Após o período de aclimatação, durante sete dias foi oferecido aos ratos dos grupos II e IV, etanol diluído a 10°GL, com água destilada. Esta diluição foi aferida por um alcoômetro. Na segunda semana, a diluição do etanol foi de 20°GL, e a partir da terceira semana, até a conclusão do experimento (260 dias), o etanol foi diluído a

30°GL (figura 1 a e 1b). A água foi suspensa desde o início da introdução do etanol. No grupo controle (GI) e no grupo do tabagismo (GIII) foram oferecidos água *ad libitum* e ração comercial padrão durante todo o período do estudo.

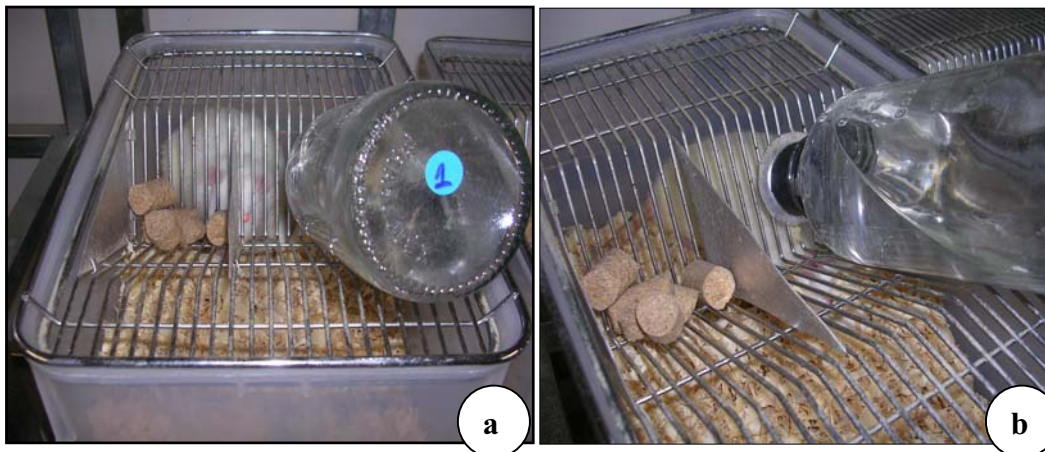


Figura 1. Metodologia de oferta de líquidos e ração aos animais do experimento. Em a e em b, detalhes das conexões dos frascos de oferta de líquidos e de ração.

3.4.2 Exposição à fumaça de cigarro

Os animais dos grupos III e IV foram submetidos, por um período de 260 dias, à exposição diária à fumaça do cigarro em incubadora modificada, através do método padronizado em nosso laboratório experimental (Paiva *et al.*, 2003). Os ratos foram colocados em uma câmara transparente, com um volume de aproximadamente 95 x 80 x 65 cm, conectada ao “aparelho de fumar” (Figuras 2a, 2b e 3). *Puffs* de fumaça foram aspirados dos cigarros por vácuo, utilizando-se o “aparelho de fumar”, e depois introduzidos na câmara, durante um período de 30 minutos (figura 3), após o qual a fumaça foi exaurida do local. Durante a primeira semana, a fumaça foi liberada a uma taxa de 5 cigarros, uma vez ao dia, sete dias por semana, no período da manhã. O número de cigarros foi aumentado, progressivamente, para uma taxa de 10, uma vez por

dia, sete dias por semana, da segunda semana até o final do período de estudo. O cigarro utilizado foi de marca comercial com a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono.

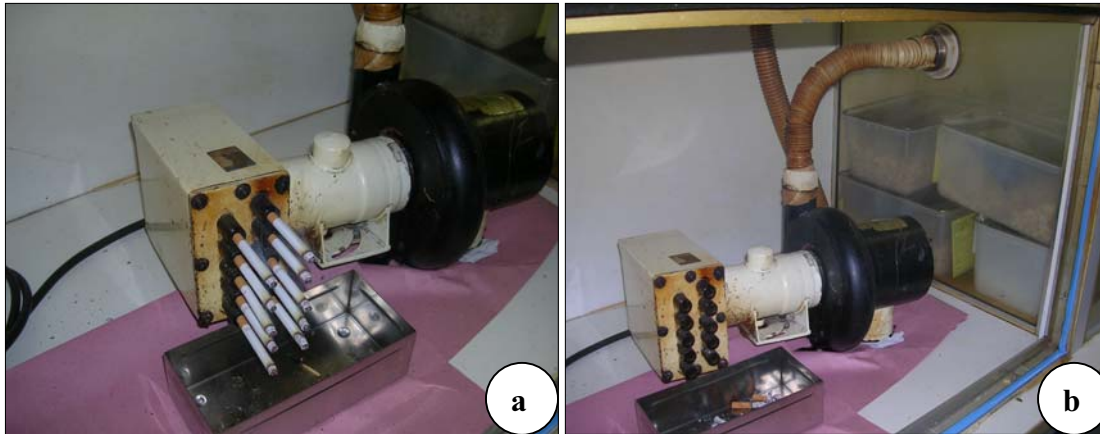


Figura 2. Aparelho de fumar: em a, detalhes do local de adaptação dos cigarros; em b, detalhes da conexão do aparelho de fumar à câmara onde estão os animais expostos à fumaça.



Figura 3. Detalhes da metodologia da experimentação para exposição dos animais à inalação da fumaça de cigarro. Do lado esquerdo da figura está posicionada a máquina de fumar e do lado direito a câmara contendo os animais.

3.4.3 Procedimento do sacrifício

No dia do sacrifício, após 260 dias do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e anestesiados com Pentobarbital sódico (50mg/kg) intraperitoneal, sendo complementado com mais um terço da dose, nos casos necessários, para se obter plano anestésico satisfatório. Os ratos foram considerados anestesiados quando a respiração tornou-se regular e superficial, e a musculatura esquelética flácida, com concomitante desaparecimento dos reflexos oculares. Foi realizada tricotomia cérvico-torácica e abdominal, anti-sepsia com álcool iodado a 2%, laparotomia mediana xifopúbica com bisturi lâmina 20 em pele e subcutâneo e secção completa da veia cava inferior e da artéria renal direita para o sacrifício por sangria. Após o sacrifício, a incisão foi estendida superiormente até a região mandibular e com auxílio de pinças e tesouras delicadas, o arco mandibular ósseo foi exposto e fraturado bilateralmente na região parasinfisária, com auxílio de tesoura de *Mayo*, para facilitar a remoção em bloco do segmento aereodigestivo que abrangeu língua, faringe, laringe e primeiros anéis traqueais (Figuras 4 a e b).

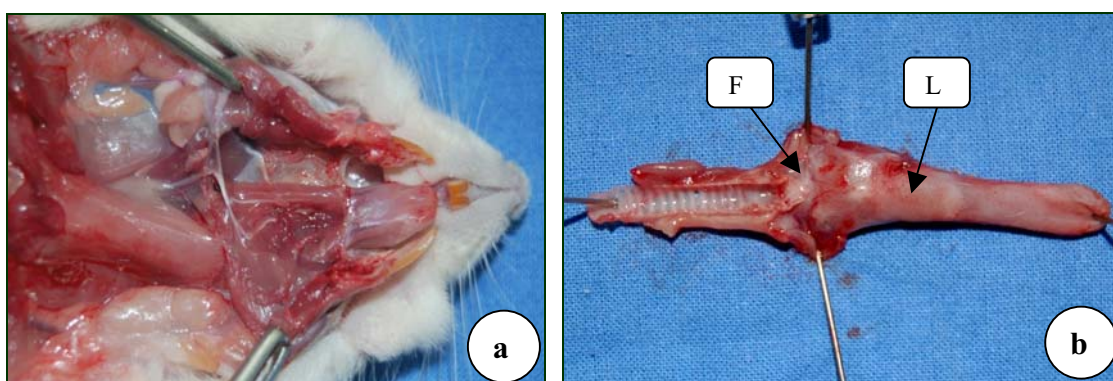


Figura 4. Metodologia cirúrgica utilizada para remoção da peça histológica. Em a, exposição cervical após fratura mandibular parasinfisária bilateral para remoção do segmento de língua faringe e laringe em bloco; em b, segmento da via aérea após a remoção e pontos de biópsia em língua (L) e faringe (F).

O segmento isolado foi cuidadosamente examinado com iluminação adequada para a detecção de lesões macroscópicas, as quais quando presentes, seriam biopsiadas. Com a não identificação destas em nenhum animal, as biópsias foram realizadas, sistematicamente, na porção lateral da hipofaringe e na região da base de língua, correspondendo à região central e imediatamente à frente do V lingual (figura 4b). Os fragmentos de ambas as regiões, com dimensões de 1x 0,5 cm em língua e 0,5 x 0,5 em faringe, foram submersos em frascos contendo solução de formalina a 10% para fixação, identificados por grupos e encaminhados para estudo de microscopia de luz.

3.4.4 Estudo de Microscopia de Luz

Após fixação em solução de formalina a 10% por 48 horas, os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados por métodos convencionais e corados pela hematoxilina & eosina. As alterações histológicas foram examinadas pelo pesquisador e por patologista experiente, por meio de microscópio de luz (marca Zeis – Carl Zeiss do Brasil Ltda; modelo Axiostar plus), com diferentes aumentos e captura de imagens em câmera digital, sem conhecimento prévio dos grupos aos quais pertenciam as lâminas, sendo as mesmas identificadas por letras e números. Os parâmetros histológicos analisados foram: hiperplasia de células apicais, hiperplasia de células basais, hiperkeratose, displasia, apoptose, aumento de vasos, fibrose, infiltrado linfocitário e de polimorfonucleares neutrófilos.

Para cada parâmetro estudado foi utilizado o seguinte escore semi-quantitativo: 0 – sem alteração, 1 – alteração discreta, 2 – alteração moderada e 3 – alteração intensa.

3.5 Análise estatística

Os resultados das análises histológicas foram apresentados em tabelas, quantificados e submetidos à análise estatística. Para esta finalidade, para todas as variáveis foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn, sendo considerado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADO

Durante o período experimento todos os animais sobreviveram. O exame macroscópico do segmento de língua e faringe, removidos logo após o sacrifício, não detectou alterações macroscópica na mucosa que justificassem a realização de outras áreas de biópsia.

4.1 Estudo de microscopia de luz

4.1.1 Análise histopatológica da superfície da língua

A tabela 1 apresenta os escores das análises histopatológicas dos fragmentos de língua realizadas em cada grupo de estudo. Em GI (grupo controle) em apenas dois animais foi observado aumento de número de vasos na lâmina própria, recebendo pontuações nulas os demais parâmetros. A superfície da língua mostrou-se recoberta por papilas, havendo predomínio das filiformes, as quais recobriam grande parte da superfície dorsal da língua. Papilas filiformes correspondem a projeções epiteliais cônicas e alongadas sem corpúsculos gustativos (figura 5). À coloração pela hematoxilina-eosina (H&eE) observou-se que as células da camada basal são mais eosinofílicas e apresentavam distribuição uniforme, mantendo-se dispostas perpendicularmente à membrana basal (figura 6). As células das camadas mais superiores apresentavam citoplasma maior e continham grânulos eosinofílicos queratohialinos, formando a camada granulosa (figura 6). A membrana basal é contínua e acompanhava as projeções das papilas filiformes por toda a superfície. Abaixo da

membrana basal, a lâmina própria se dispõe em uma faixa estreita contendo fibroblastos e tecido conjuntivo, o qual penetrava entre os feixes musculares (figura 5). Abaixo da lâmina própria feixes musculares se dispunham em várias direções, distribuindo-se em uma rede tridimensional, compondo o corpo da língua (figura 5) Nos animais expostos à ingestão de álcool etílico (GII), à fumaça de cigarro (GIII), ou à associação de ambos os agentes (GIV), diversas alterações histopatológicas foram identificadas, como é possível constatar na tabela 1. Nestes grupos, os parâmetros que receberam os maiores escores foram: hiperplasia de células apicais (GII-60%, GIII-30%%, GIV-20%; p-0, 03), hiperkeratose (GII-70%, GIII-30%%, GIV-30%; p-0, 01), displasia (GII-60%, GIII-60%%, GIV-50%; p-0, 02), hiperplasia de células basais (GII-60%, GIII-40%; p-0, 003), apoptose (GII, 60%; GIII-40%; GIV-60%; p-0, 017), entre outros menos freqüentes. Displasia grave foi detectada em três animais de GII e em dois de GIV, caracterizando o carcinoma in situ. Algumas dessas alterações estão ilustradas nas figuras de 7 a 14.

Tabela 1. Análise histológica das biópsias de língua em cada grupo de estudo.

Parâmetro	GI-controle					GII- Etilismo					GIII-Tabagismo					GIV-Etilismo e Tabagismo				
	Escore					Escore					Escore					Escore				
	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%
Hiperplasia cels apicais (p-0,03)	10	0	0	0	00 b	4	4	2	0	60 a	7	2	1	0	30 ab	8	1	1	0	20 Ab
Hiperplasia cels basais (p-0,003)	10	0	0	0	00 b	4	6	0	0	60 a	6	3	1	0	40 ab	10	0	0	0	00 B
Hiperceratose (p-0,01)	10	0	0	0	00 b	3	5	2	0	70 a	7	3	0	0	30 ab	7	2	1	0	30 Ab
Aumento de vasos (p-0,18)	8	2	0	0	20	4	6	0	0	40	9	0	1	0	10	7	0	3	0	30
Fibrose (p-0,23)	10	0	0	0	00	8	0	2	0	20	8	1	1	0	20	10	0	0	0	00
Linfócitos (p-0,39)	10	0	0	0	00	10	0	0	0	00	9	1	0	0	10	10	0	0	0	00
PMN (p- 0,23)	10	0	0	0	00	8	0	2	0	20	10	0	0	0	00	8	2	0	0	20
Apoptose (p-0,017)	10	0	0	0	00 b	4	3	3	0	60 a	6	4	0	0	40 ab	4	6	0	0	60 A
Displasia (p- 0,02)	10	0	0	0	00 b	4	2	1	3	60 a	4	4	2	0	60 a	5	2	1	2	50 Ab

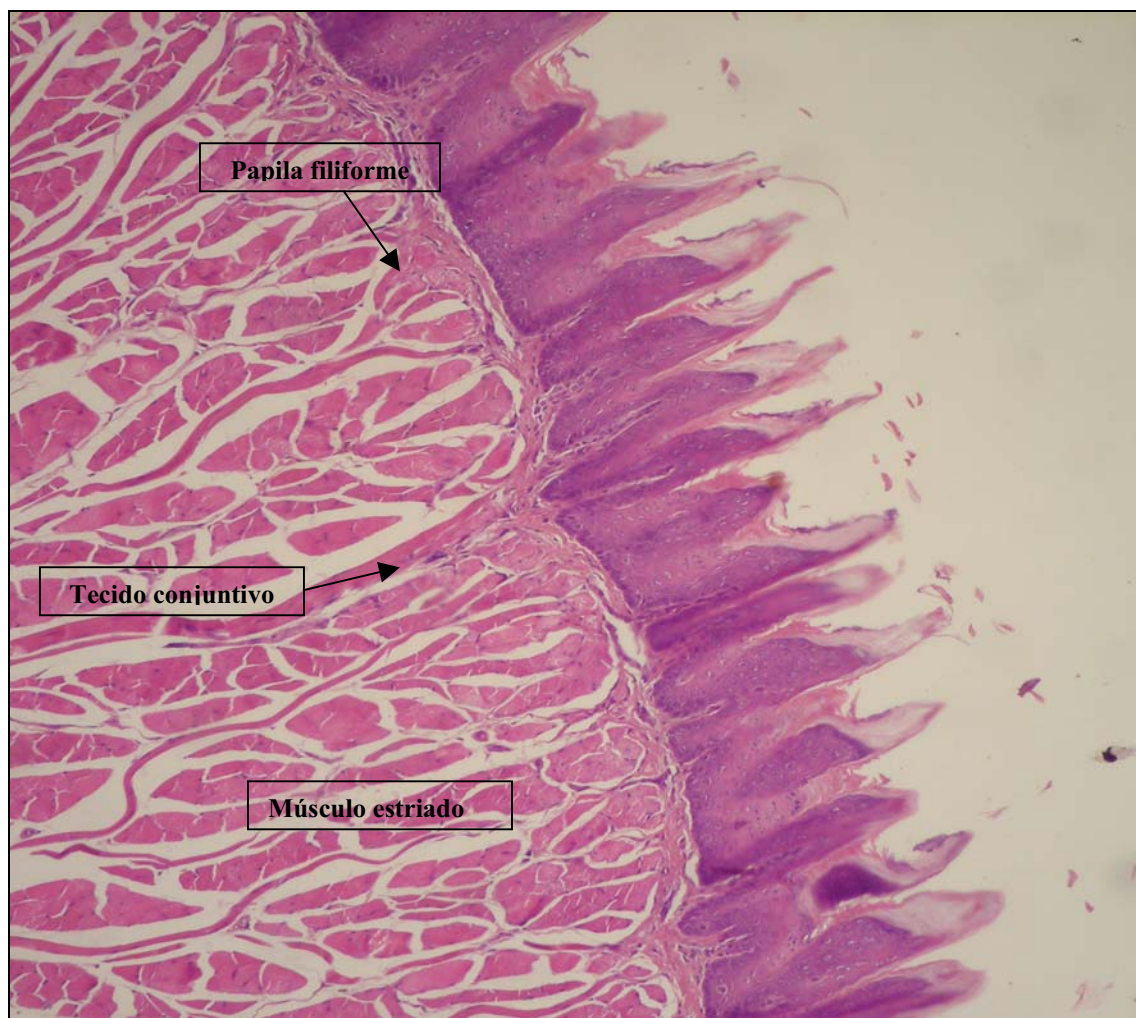


Figura 5. Superfície dorsal da língua de ratos do grupo controle recoberta pelas papilas filiformes, sustentadas por uma membrana basal, disposta sobre delicada faixa de tecido conjuntivo adjacente à musculatura. Microscopia de Luz, H&E, 40X.

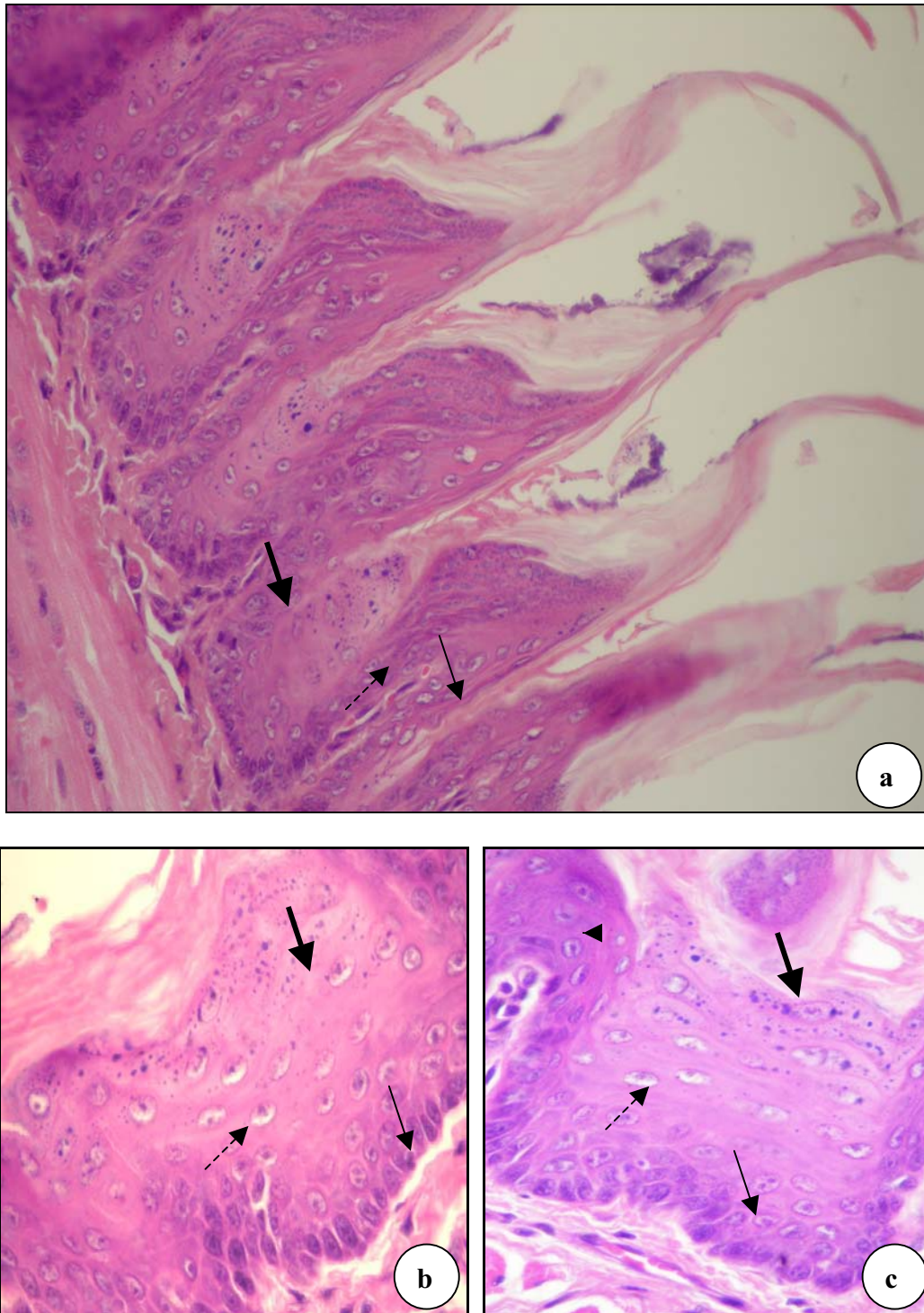


Figura 6. Superfície da língua de ratos do grupo controle recoberta por papilas filiformes, células basais alinhadas e uniformes (a, b, c, setas estreitas); células adjacentes com citoplasma mais volumoso (a,b,c, setas interrompidas). Presença de grânulos hipercrômicos na superfície distal do epitélio (a,b,c, setas largas). Microscopia de Luz, H&E, a (60X), b (80X), c (80X).

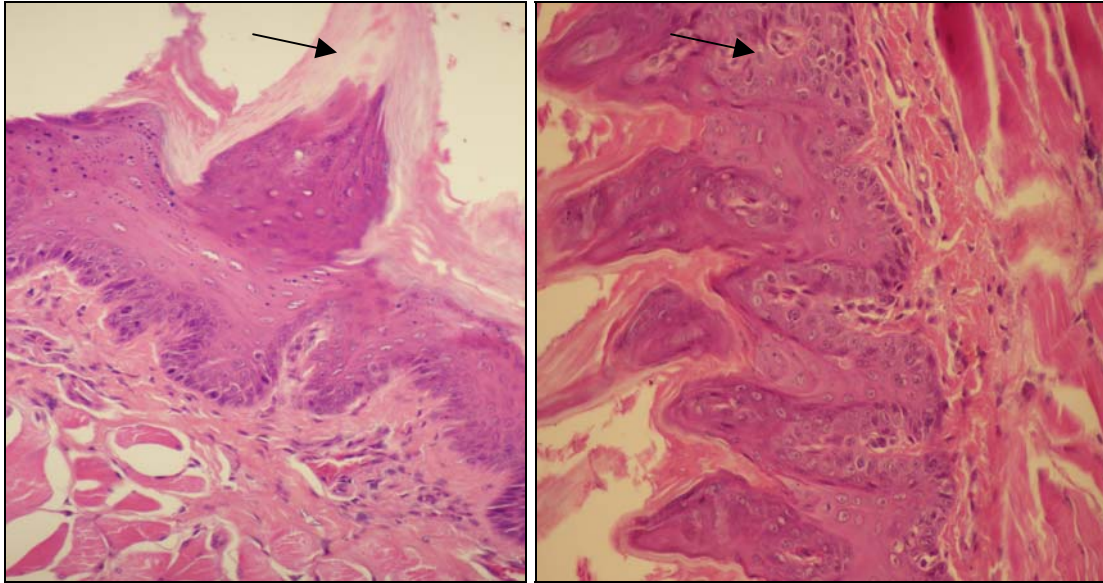


Figura 7-Superfícies de línguas de ratos de G-II, sendo evidenciado detalhe da extremidade da papila filiforme recoberta por uma camada ceratótica (setas). Microscopia de luz, H&E, 40X

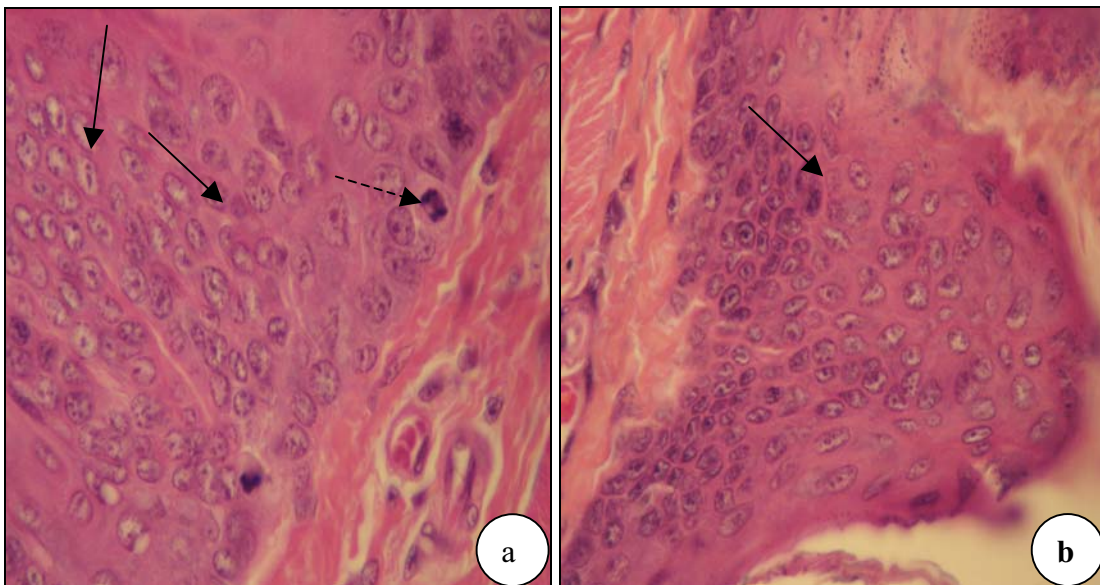


Figura 8 – Superfície de língua de ratos de G-II com hiperplasia de células epiteliais (setas contínuas) e figuras de mitose (seta pontilhada). Microscopia de Luz,H&E, a (60X), b (40X).

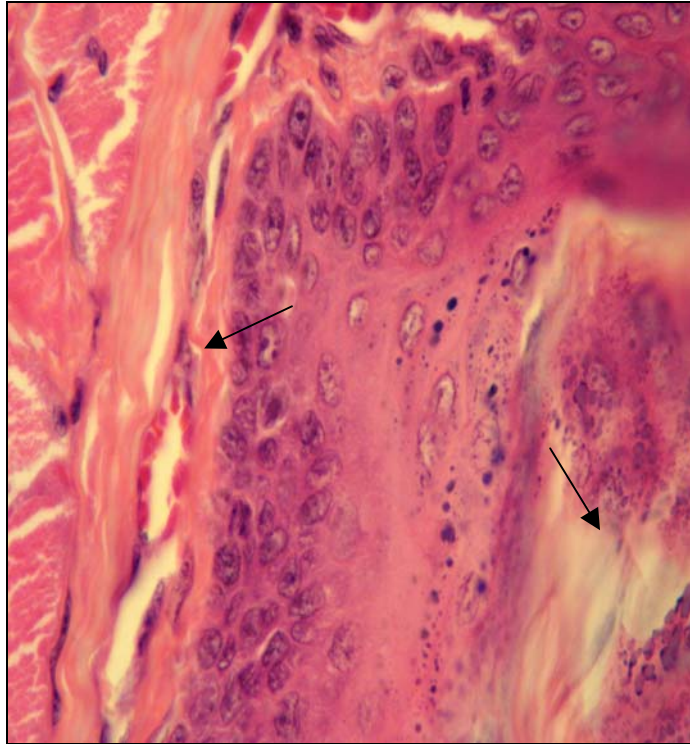


Figura 9- Superfície de língua de rato de G-II com áreas focais de displasia leve (setas). Microscopia de Luz, H&E, 80X.

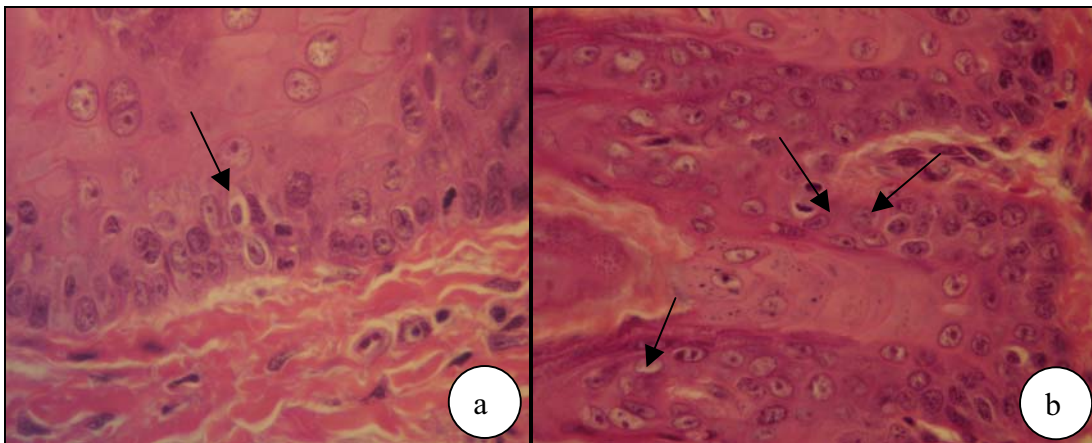
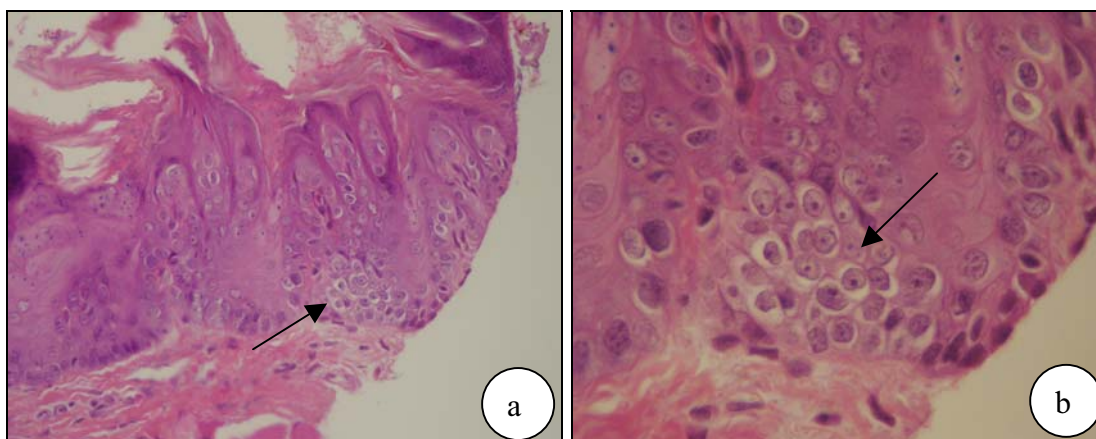
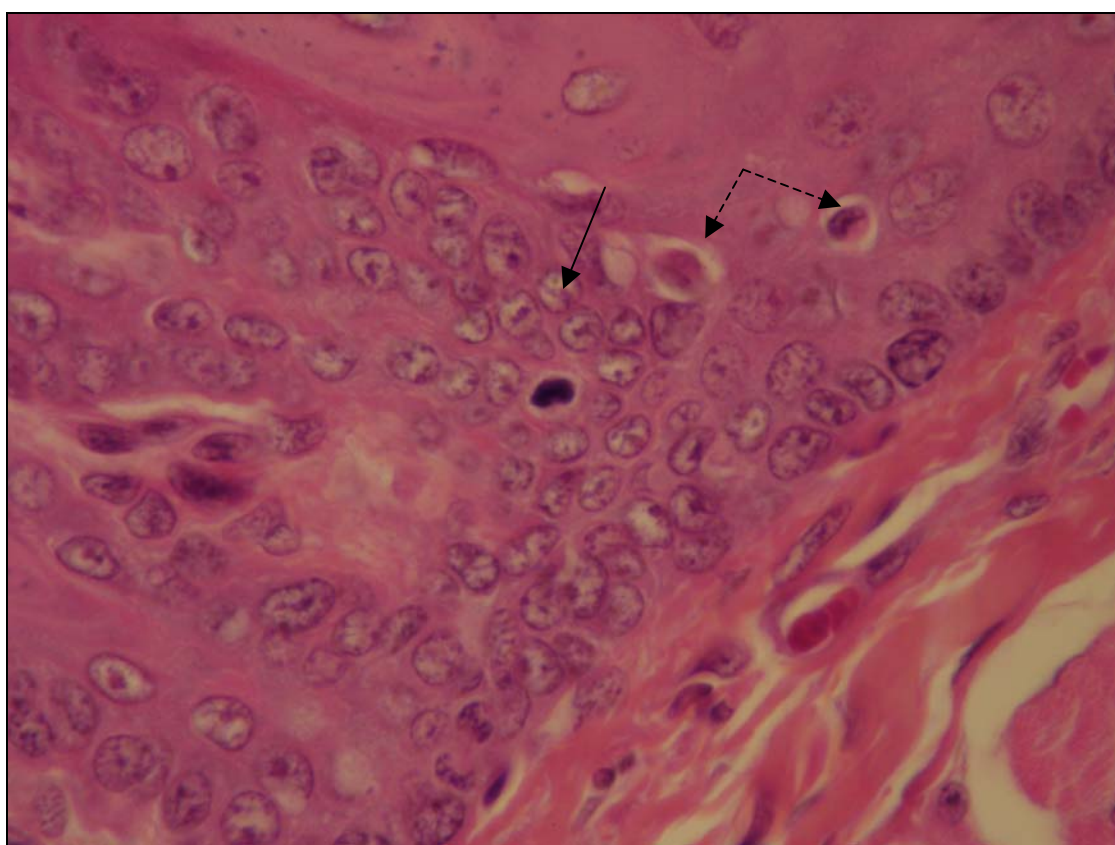


Figura 10. Superfície de língua de ratos de G-II com células apoptóticas (setas). Microscopia de Luz, H&E, 60X (a e b).



**Figura 11- Superfície de língua de ratos de G-IV com displasia focal moderada (setas).
Microscopia de Luz, H&E, a (40X), b (80X).**



**Figura 12- Superfície de língua de rato de G-IV com área de displasia moderada (seta);
células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz, H&E, (80X).**

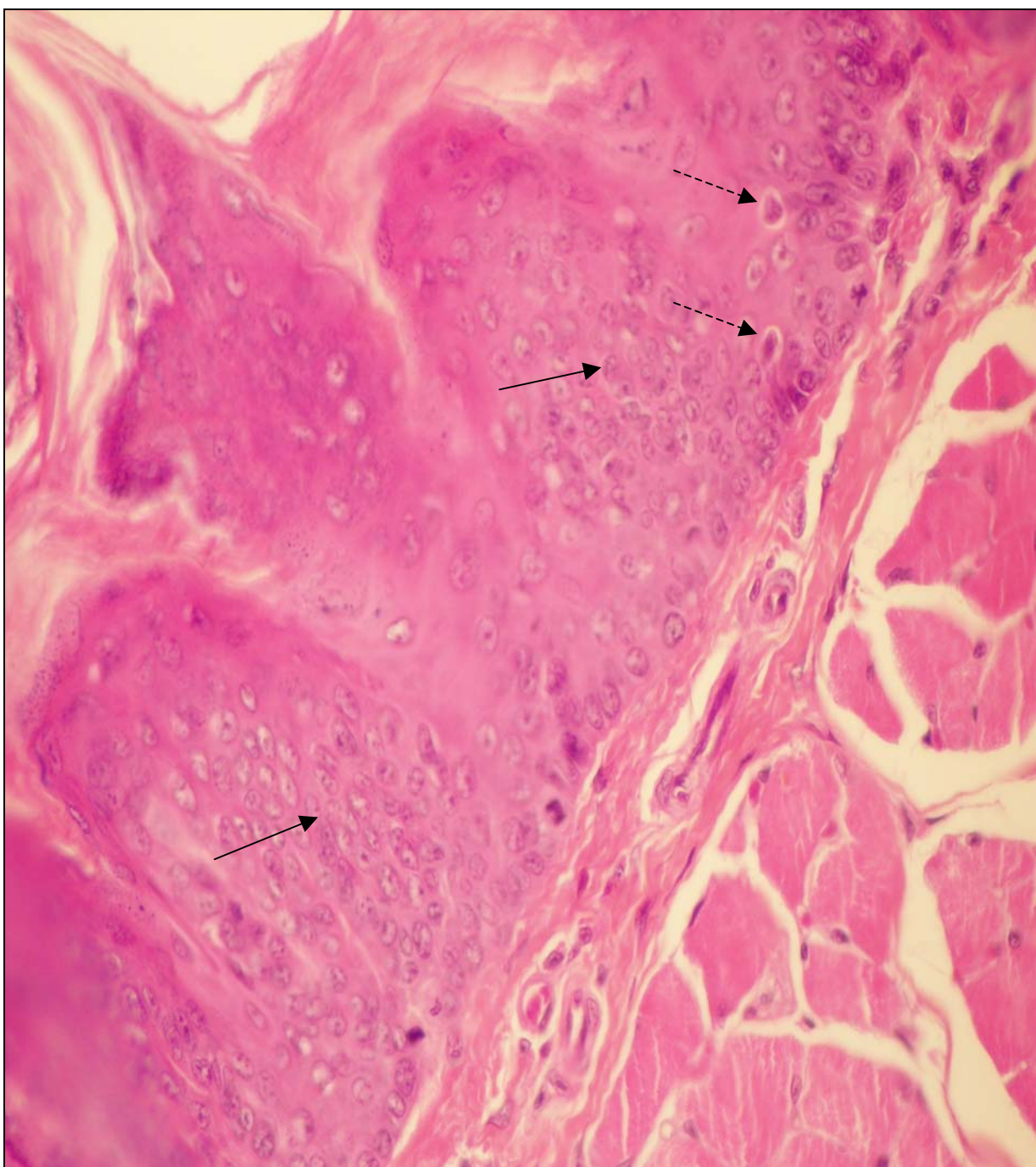


Figura 13 – Superfície de língua de rato de G-IV com áreas focais de displasia intensa (setas contínuas) e células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz,H&E, 80X.

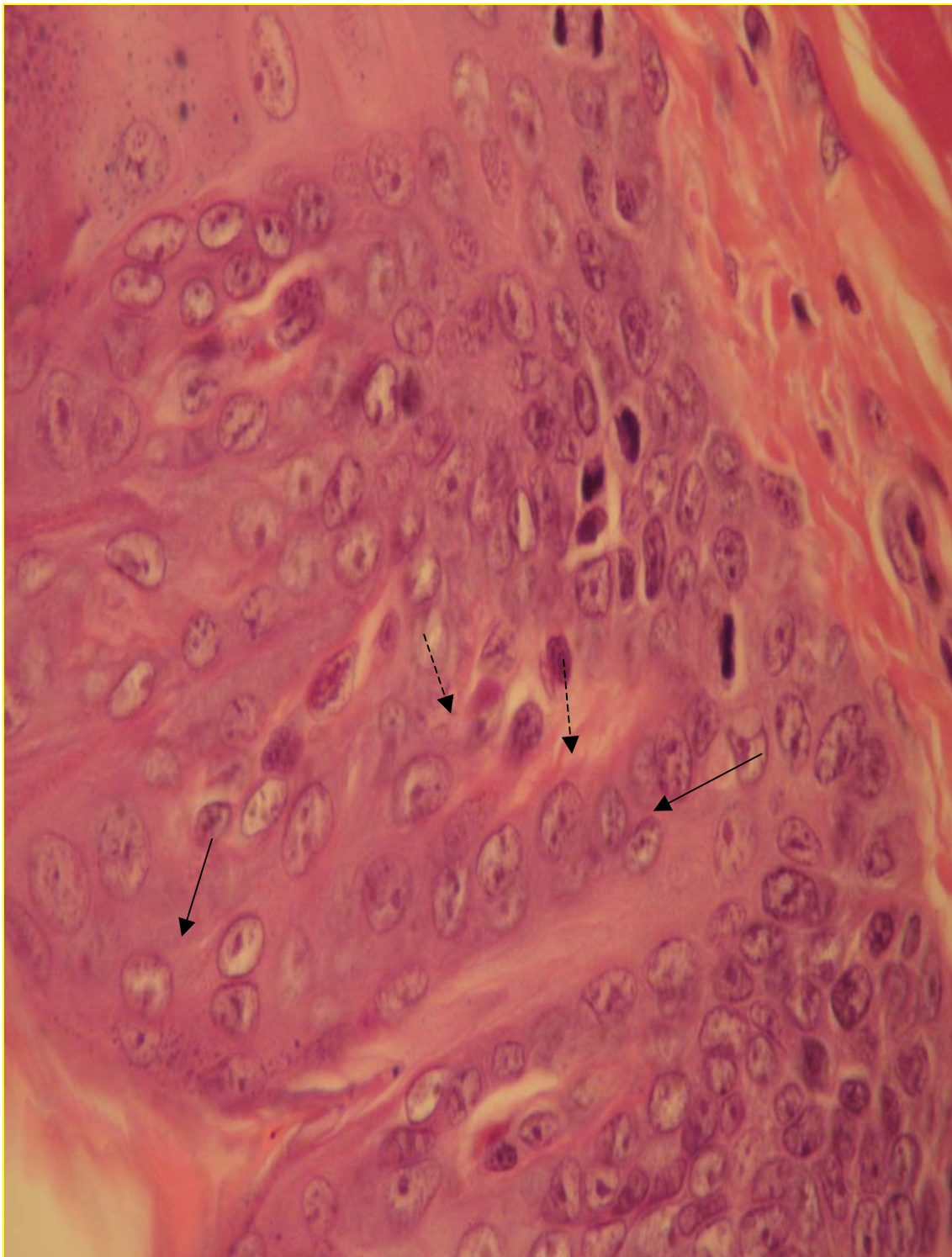


Figura 14 –Superfície de língua de rato de G-II com áreas de displasia intensa (setas contínuas) e células apoptóticas (setas pontilhadas). Microscopia de Luz, H&E, 60X.

4.1.2 Análise histopatológica da superfície da faringe

A tabela 2 apresenta os escores das análises histológicas dos fragmentos de faringe realizadas em cada grupo de estudo. Em GI (grupo controle), algumas alterações foram detectadas como hiperplasia de células apicais, hiperkeratose e aumento do número de vasos da lâmina própria. Essas alterações foram também registradas nos animais dos demais grupos, porém em maior intensidade. No grupo controle o epitélio de cobertura da faringe apresentou-se do tipo pavimentoso pluriestratificado, composto por 4 a 5 camadas de células sobrepostas, as quais conforme ganhavam posições mais distais, tornavam-se alongadas e com citoplasma mais escasso, sendo recobertas por uma camada hiperkeratótica delicada. As células da camada basal apresentavam-se alinhadas e dispostas perpendicularmente à membrana basal. A lâmina própria continha feixes delicados de fibras colágenas, alguns fibroblastos e poucos capilares. Algumas glândulas mucosas se distribuem abaixo do feixe de colágeno (figuras 15 e 16).

Nos animais expostos à ingestão de álcool etílico (GII), à fumaça de cigarro (GIII), ou à associação de ambos os agentes (GIV), diversas alterações histológicas foram identificadas nas biópsias da faringe, como é possível constatar na tabela 2. Nesses grupos, os parâmetros que receberam os maiores escores foram: hiperplasia de células apicais (GII-40%, GIII-30%, GIV-70%; p=0, 29); hiperkeratose (GII-50%, GIII-80%, GIV-40%; p=0, 016); displasia (GII-50%, GIII-80%, GIV-50%; p=0, 007); hiperplasia de células basais (GII-30%, GIII-40%; GIV-40%; p=0, 14), entre outros menos frequentes. Displasias foram identificadas nos animais dos três grupos de leve a moderada intensidade, sendo que em um animal do grupo III (tabagismo) foi observado um caso de displasia de grau intenso ou carcinoma *in situ*. As figuras 17 a 22 ilustram as principais alterações observadas.

Tabela 2. Análise histológica das biópsias de faringe em cada grupo de estudo.

Parâmetro	GI – controle					GII - Etilismo					GIII -Tabagismo					GIV- Etilismo e Tabagismo				
	Escore					Escore					Escore					Escore				
	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%
Hiperplasia céls apicais (p-0,29)	7	3	0	0	30	6	2	2	0	40	7	1	2	0	30	3	5	2	0	70
Hiperplasia de células basais (p-0,14)	10	0	0	0	0	7	3	0	0	30	6	2	2	0	40	6	2	2	0	40
Hiperkeratose (p-0,016)	8	2	0	0	20 b	5	1	4	0	50 ab	2	1	7	0	80 a	6	2	2	0	40 ab
Aumento vasos (p-0,91)	7	3	0	0	30	8	2	0	0	20	7	3	0	0	30	8	2	0	0	20
Fibrose (p-0,29)	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	9	0	1	0	10	8	2	0	0	20
Linfócitos (p-0,32)	10	0	0	0	0	7	3	0	0	30	8	1	1	0	20	7	3	0	0	30
PMN (p-0,48)	10	0	0	0	0	8	2	0	0	20	8	2	0	0	20	9	1	0	0	10
Apoptose (p-0,36)	10	0	0	0	0	8	2	0	0	20	7	3	0	0	30	8	2	0	0	20
Displasia (p-0,007)	10	0	0	0	0 b	5	5	0	0	50 ab	2	6	1	1	80 a	5	2	3	0	50 ab

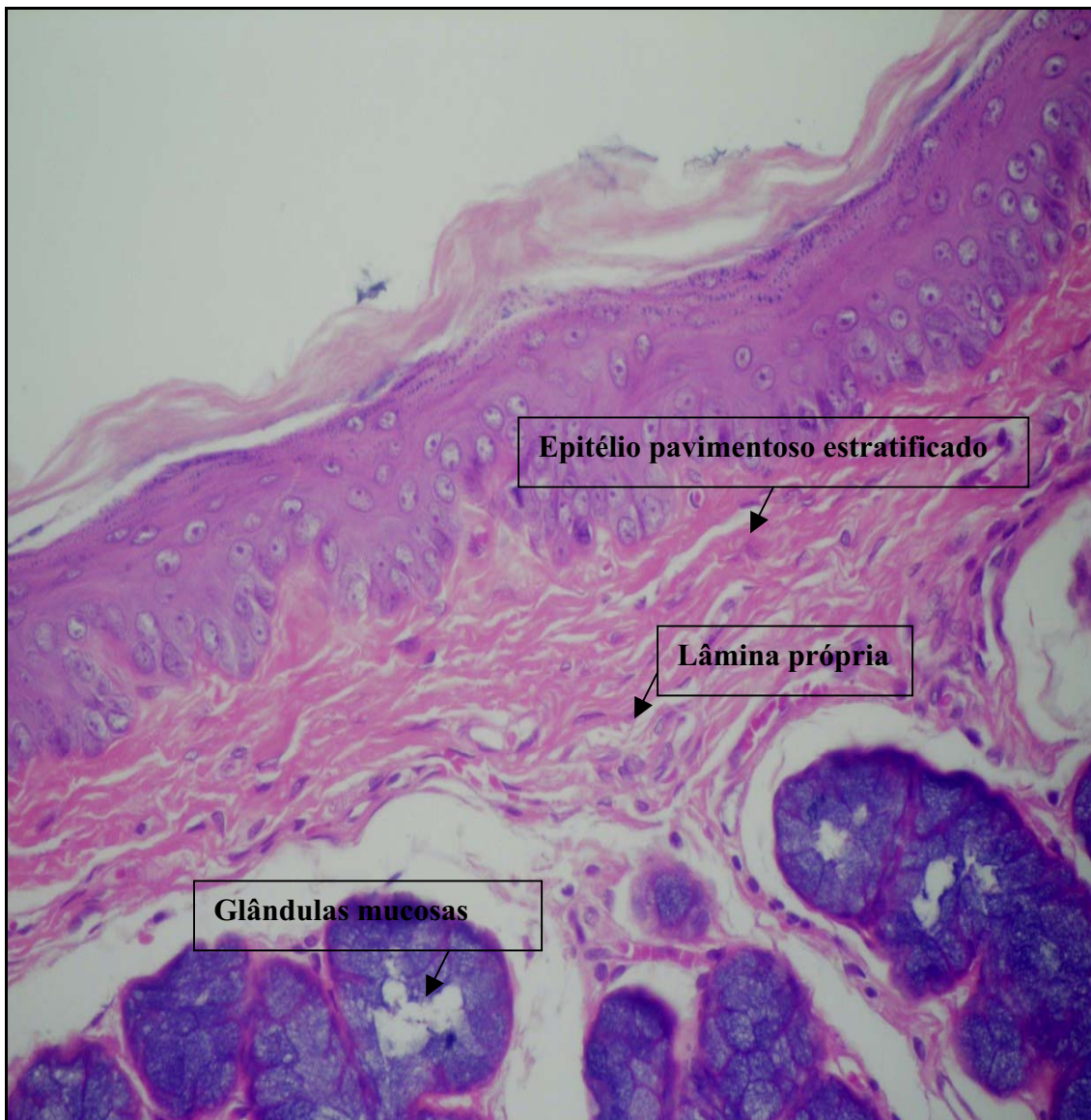


Figura 15. Epitélio de cobertura da região da faringe de rato de G-I; nota-se que o epitélio pluriestratificado repousa sobre uma membrana basal delicada abaixo da qual se distribui uma delicada rede de fibras colágenas e agrupamentos glandulares. Microscopia de Luz, H&E,60X.

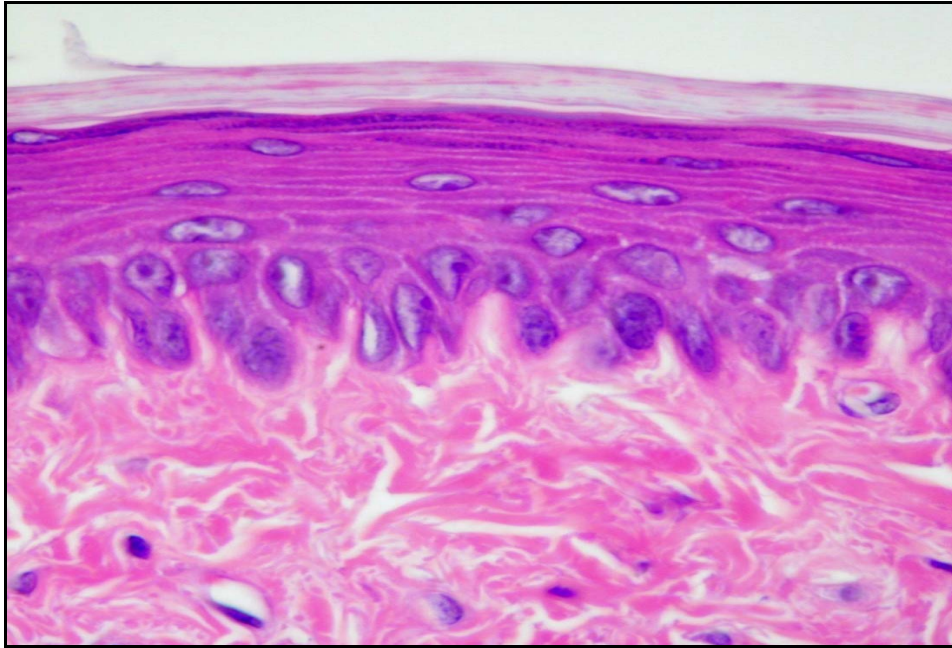


Figura 16. Superfície de faringe de rato de G-I com epitélio pavimentoso estratificado. Detalhes da distribuição e do formato das células epiteliais e da delicada camada hiperqueratômica. Microscopia de Luz, H&E, 80X.

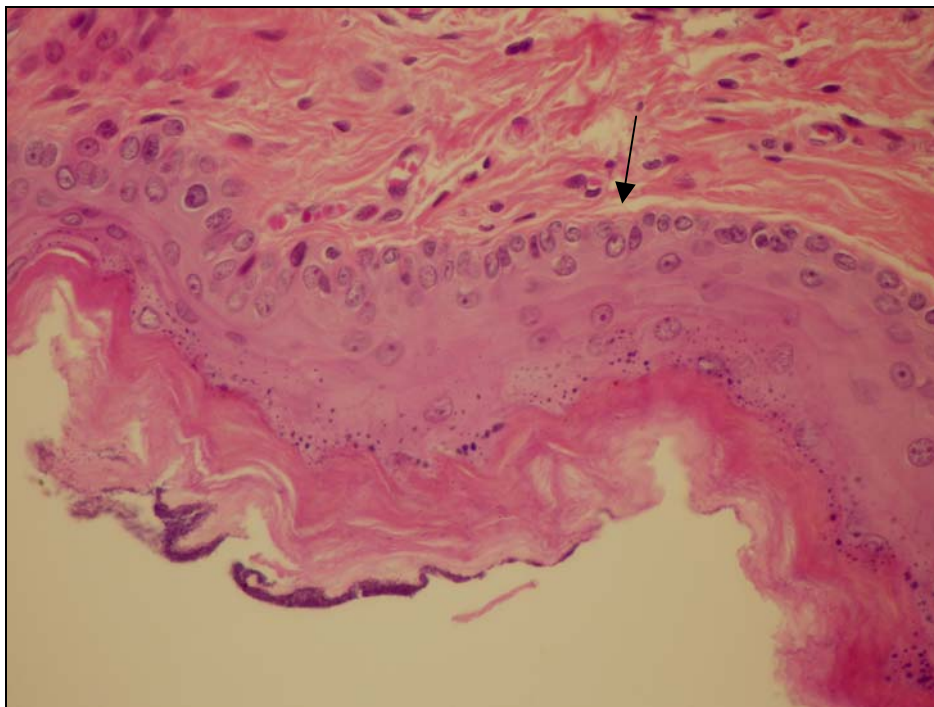


Figura 17. Superfície de faringe de rato de G-III com hiperqueratose epitelial intensa e vasodilatação na lâmina própria. Microscopia de Luz, H&E, 60X.

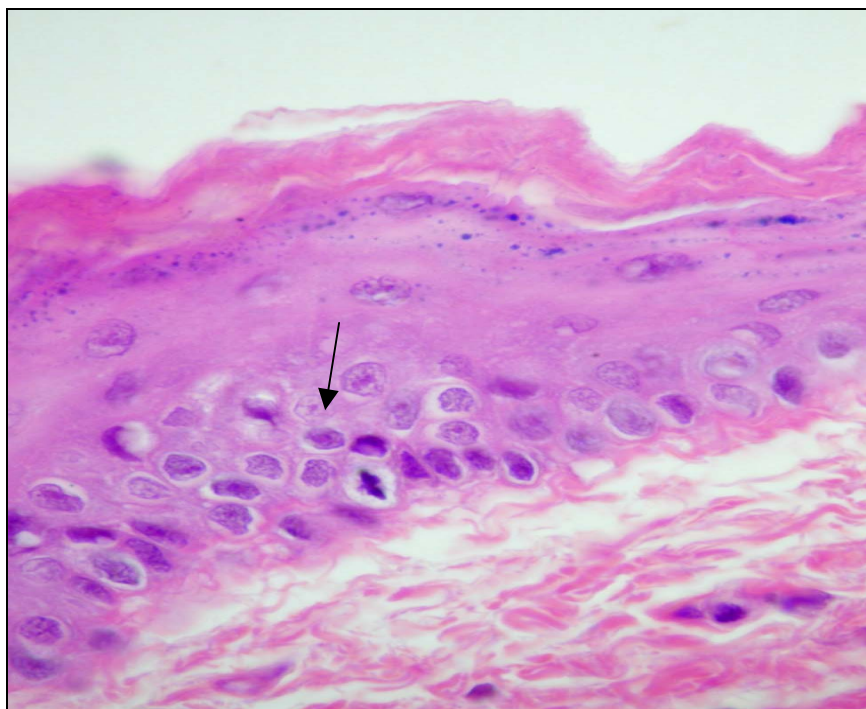


Figura 18. Superfície de faringe de rato de G-III com área de displasia leve . Microscopia de Luz, H&E, 60X.

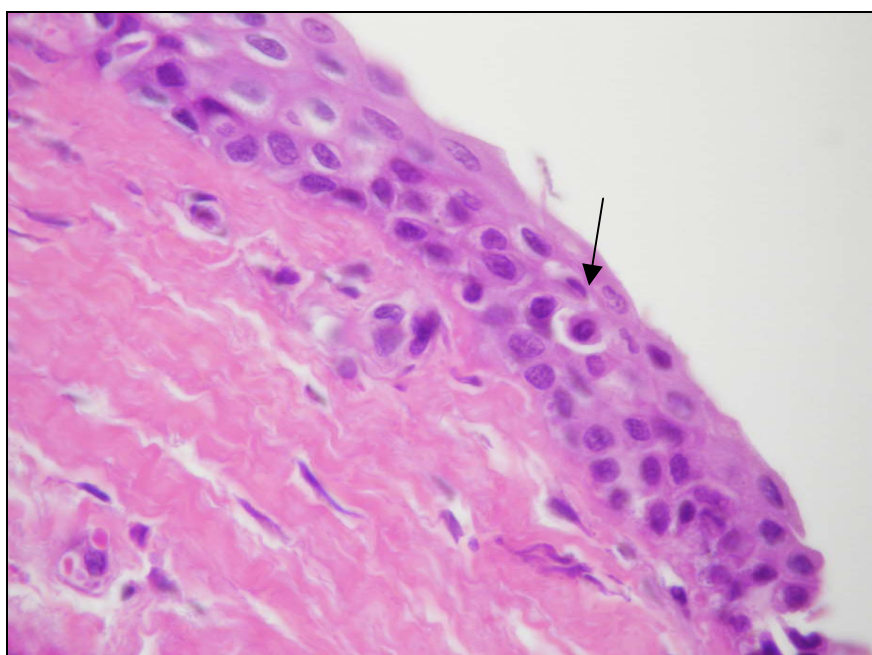


Figura 19. Superfície de faringe de rato de G-IV com displasia epitelial moderada. Microscopia de Luz, H&E,60X.

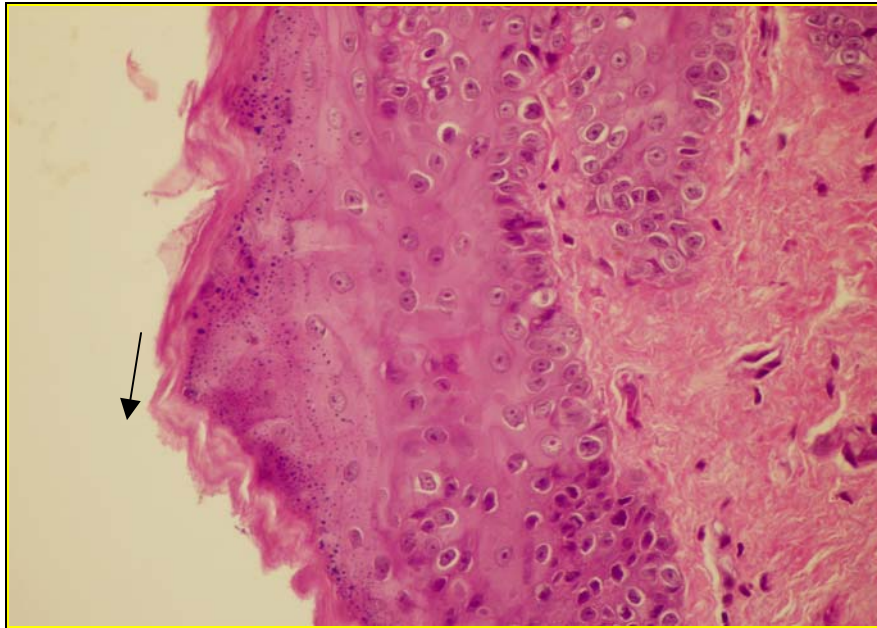


Figura 20 – Superfície de faringe de rato de G-III com displasia intensa focal (seta). Microscopia de Luz, H&E, 60X

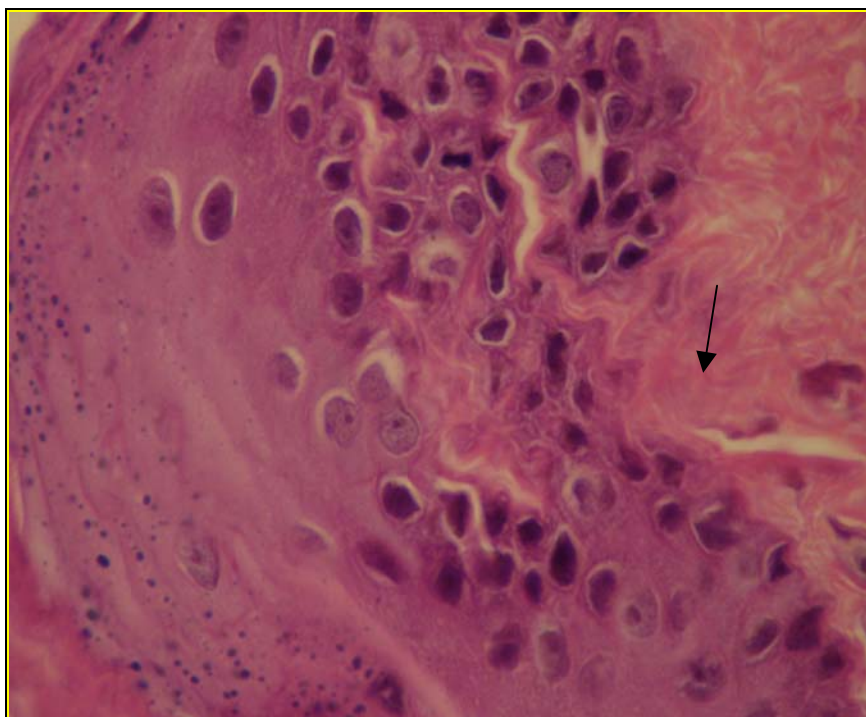


Figura 21 – Superfície de faringe de rato de G-III com displasia intensa focal (seta). Microscopia de Luz, H&E, 80X.

5 DISCUSSÃO

Diversos modelos experimentais têm sido descritos para avaliar o poder carcinogênico de algumas substâncias, das quais o óxido de nitroquinolina (4NOO) é uma das mais estudadas (Navarro *et al.*, 1994; Teicher, 2006; Ribeiro & Salvadori, 2007; Minicucci *et al.*, 2010). Navarro *et al.* (1994) observaram alterações estruturais no palato e na língua de ratos a partir de dois meses da aplicação local diária dessa solução, havendo inicialmente perda das rugosidades palatinas e redução das papilas linguais. Alterações mais relevantes foram registradas nos animais expostos durante período maior, sendo que aos seis meses a mucosa de contato apresentava aspecto papilomatoso ou ulcerado. A análise histológica dessas áreas revelou hiperkeratose, disqueratose focal acantolítica, além de carcinoma bem diferenciado. Ribeiro & Salvadori (2007) estudando o poder carcinogênico dessa mesma substância expuseram 40 ratos à ingestão diária de óxido de nitroquinolina (4NOO) diluído em água de beber, sendo evidenciado após 12 semanas, hiperplasia e displasia epitelial de forma leve ou moderada sobre a mucosa da língua. Alterações mais graves como displasia severa e carcinoma escamoso foram observadas nesse sítio somente após 20 semanas da exposição. A mucosa da gengiva mostrou-se mais resistente, não apresentando alterações relevantes com 12 semanas da exposição, porém com 20 semanas foi registrada hiperplasia escamosa gengival. Lesões orais pré-neoplásicas e expressão aumentada da proteína p53 na mucosa de língua de ratos foram também observadas por Minicucci *et al.* (2010) em estudo experimental utilizando a mesma substância.

As pesquisas com o óxido de nitroquinolina representam modelos experimentais consagrados de carcinogênese animal; entretanto os estudos que utilizam tabaco e álcool são considerados valiosos pela maior proximidade com a realidade clínica, além de merecerem destaque pela grande disseminação desses hábitos na população (INCA, 2009).

A participação do tabagismo e do etilismo na gênese do carcinoma das mucosas das vias aéreas e digestivas superiores é indiscutível e tem sido exaustivamente estudada na literatura, tanto em pesquisas clínicas (Graham *et al.*,1977; Walker *et al.*,1979; Fant *et al.*,1998; IBGE,1998; Blot,1992; Brunin *et al.*,1999; Amorim *et al.*, 2003; Fardin *et al.*,2004; Freita *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2005; Hecht, 2005; Hashibe *et al.*,2007; Fernandes *et al.*,2007; Marur & Forastiere, 2008; Baykul *et al.*, 2010) como em modelos experimentais animais (Dontenwill *et al.*, 1973; Binns, 1975; Coggins, 2001; Mauderly, *et al.*, 2004; Hutt *et al.*, 2005; Witschi, 2007). Entretanto, a contribuição isolada de cada um desses agentes carcinogênicos é difícil de ser estimada pela freqüente associação de ambos os vícios em um mesmo indivíduo. Tal fato tem incentivado os estudos experimentais controlados nos quais é possível expor animais a cada agente isoladamente ou em associação.

Em relação ao tabagismo, a partir da década de 70, diversos modelos experimentais foram propostos na literatura, diferindo-se entre eles quanto à espécie animal, modo e tempo de exposição. Hecht (2005), em interessante revisão da literatura, apresentou a relevância e as dificuldades que cercam os modelos experimentais de carcinogênese, envolvendo a exposição de animais ao tabaco. O autor enfatiza a importância da reprodução experimental de tumores relacionados ao cigarro, a fim de concretizar as evidências epidemiológicas apontadas nas pesquisas clínicas, uma vez que o tabaco é responsável por 30% do total de óbitos por câncer em países

desenvolvidos. Destaca a necessidade de reproduzir as condições experimentais mais próximas possíveis da realidade, como conhecimento dos componentes do cigarro utilizado e a frequência e dose da exposição. O autor salienta, que os animais possuem estruturas anatômicas diferentes das do humano, como por exemplo, hipertrofia apreciável das conchas nasais, local que pode ser retida grande quantidade das substâncias nocivas inaladas. O comportamento do animal exposto à fumaça de cigarro também é diferente ao do homem, pois o animal tende a manter a respiração mais superficial para se proteger do irritante inalatório, ao contrário do tabagista que aspira com voracidade a fumaça do cigarro. O autor apresentou diversos estudos com exposição de animais de várias espécies aos componentes do tabaco, incluindo camundongos (Hutt *et al.*, 2005), ratos (Mauderly *et al.*, 2004), hamsters (Dontenwill *et al.*, 1973), cães, coelhos e primatas não humanos (Coggins, 2001). As vias e o tempo de exposição diferiram entre os autores; alguns animais inalaram fumaça pela via nasal, outros pelo traqueostoma, outros ainda foram totalmente expostos no interior de câmaras, à semelhança dos animais deste estudo. O tempo de exposição utilizado pelos autores também variou muito, desde poucas semanas até aproximadamente 900 dias.

Parte da fisiopatologia dos mecanismos carcinogênicos relacionados às substâncias nocivas do tabaco e das bebidas alcoólicas é conhecida entretanto ainda há muitos fenômenos a serem desvendados. A seqüência de eventos patológicos parece ter início com a instalação do processo inflamatório sobre as mucosas, gerado a partir do efeito térmico do cigarro e da ação irritativa dos componentes do tabaco, favorecida pelo efeito vasodilatador das bebidas alcoólicas, permitindo a exposição da mucosa às substâncias nocivas do cigarro, responsáveis por alterações genômicas e lesões pré-neoplásicas (Boffetta & Hashibe, 2006; Kawanishi *et al.*, 2006). Chen *et al.* (1994), em estudo em hamsters, realizaram aplicação oral de substâncias nocivas do tabaco como

N-Nitrosornicotina a 0,01% (NNN), associada ou não à nicotina a 6%, três vezes por semana durante 13 meses. Em biópsias orais (região jugal) e gástricas foram evidenciadas áreas de hiperplasia, hiperkeratose e displasia de grau moderado, principalmente quando os animais foram expostos à associação dos agentes. A exposição aos componentes nocivos do tabaco por menor período foi estudada por Papageorge *et al.*(1996), durante avaliação dos efeitos das nitrosaminas, especificamente da N-Nitrosornicotina (NNN), sobre a mucosa oral de 36 hamsters, por meio de aplicação local da substância em suspensão em óleo mineral, cinco dias da semana durante 24 semanas, sendo os animais sacrificados em diferentes momentos (6, 8, 12 e 24 semanas). Com seis semanas, os autores observaram hiperemia no local da aplicação; com 12 semanas constataram hiperplasia epitelial e inflamação; com 24 semanas observaram displasia leve. Os resultados deste estudo indicaram que a alteração mais precoce é o processo inflamatório, o qual pode ser identificado também clinicamente durante exame oral das mucosas de pacientes fumantes e etilistas, representado pelo edema e congestão.

Lesões orais mais relevantes como hiperplasia e leucoplasia das mucosas da boca, faringe, laringe são respostas da exposição crônica e mais duradoura aos agentes irritativos, como observado em pacientes com muitos anos de vício e com carga tabágica elevada. O processo inflamatório crônico das mucosas tem sido considerado um componente crítico no desenvolvimento e na progressão das lesões epiteliais como hiperplasias, disqueratoses, displasias e neoplasias, uma vez que resulta da persistência dos estímulos inflamatórios ou da falta de regulação dos mecanismos endógenos antiinflamatórios. Histologicamente, a inflamação crônica é representada por aumento do número dos vasos da lâmina própria, fibrose e infiltrado de células inflamatórias como linfócitos, neutrófilos, macrófagos e plasmócitos. Essas células inflamatórias

podem gerar grandes quantidades de fatores de crescimento e citocinas e liberar radicais livres de oxigênio e de nitrogênio, capazes de causar danos ao DNA, induzindo à contínua proliferação celular e até mesmo ao desenvolvimento de neoplasias. Esses mecanismos podem ser confirmados pelo freqüente encontro de processo inflamatório nas lâminas histológicas orais de pacientes portadores de displasias e de carcinomas (Kawanishi *et al.*, 2006; Codeño & Finol, 2008).

Como constatado acima, as pesquisas têm enfatizado a importância do processo inflamatório crônico na gênese de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas; entretanto os parâmetros relacionados à inflamação não foram relevantes no presente estudo, sendo observado apenas, em poucas biópsias da língua e da faringe, aumento no número de vasos e infiltrado de linfócitos e de polimorfonucleares neutrófilos, ressaltando-se o encontro de algumas dessas alterações também nos animais do grupo controle. Uma possível explicação é a maior resistência das mucosas das vias aéreas e digestivas, especialmente da língua, da espécie animal utilizada neste estudo (ratos) sobre a ação inflamatória dos agentes irritativos, quando comparada ao humano. Corrobora com essa hipótese, a ausência de alterações macroscópicas com relação ao aspecto, integridade, forma, consistência ou textura nas análises macroscópicas dos fragmentos de língua ou faringe após o sacrifício desses animais. Outra possível explicação é o tempo reduzido de exposição diária dos animais à inalação de fumaça de cigarro, durante apenas 30 minutos, havendo tempo suficiente para recuperação do epitélio no restante do dia, ao contrário da exposição contínua à ingestão de etanol.

Embora o processo inflamatório não tenha sido relevante nas análises histológicas do presente estudo, outras importantes alterações foram registradas nos animais dos grupos expostos diariamente aos agentes agressores, GII, GIII e GIV, como hiperqueratose, hiperplasia das células basais e das células apicais. Essas alterações são

consideradas benignas e algumas delas foram também observadas nos animais do grupo controle, embora em menor intensidade, especialmente nas biópsias da faringe. A camada de queratina que envolve as papilas filiformes e a mucosa faríngea desses animais representa proteção aos traumatismos repetidos durante a alimentação e pode se apresentar mais desenvolvida com as agressões constantes do epitélio (Evan & Vousden, 2001; Taybos, 2003; Kumar *et al.*, 2005b).

A reação proliferativa das células dos tecidos expostos à agressão contínua é comumente observada nas inflamações crônicas e desencadeada pelo contato com substâncias irritativas sobre as mucosas respiratórias, como álcool e o tabaco (especialmente benzopireno, nitrosaminas e etanol). A hiperplasia das células epiteliais tanto basais como apicais e a hiperqueratose podem também ser observadas em outras comorbidades como, por exemplo, na monilíase oral e no papiloma vírus das mucosas respiratórias. Spolidorio *et al.* (2003) e Fernandes & Crivelini (2004) descreveram alterações epiteliais orais secundárias à presença da *Candida sp* em biópsias de boca, destacando as hiperplasias fibrosas inflamatórias e as hiperqueratoses. As alterações no equilíbrio da estabilidade celular do epitélio das mucosas podem ser secundárias à exposição aos componentes do cigarro e ao etanol, e representadas por hiperplasia fibroepitelial inflamatória, displasia ou até mesmo carcinoma. A hiperplasia representa proliferação natural no número de células, secundária à intensa atividade mitótica de tecidos capazes de responder aos estímulos irritativos, porém mantém sempre o padrão morfológico das estruturas epiteliais e da membrana basal. A hiperplasia epitelial pode ser acompanhada de fibrose, aumento de vasos da lâmina própria e infiltrado inflamatório, eventos estes pouco expressivos neste estudo (Evan & Vousden, 2001; Kumar *et al.*, 2005b; Gordon-Nuñez *et al.*, 2008).

Células apoptóticas foram identificadas exclusivamente nos animais expostos aos agentes agressores. A apoptose corresponde à morte celular programada e tem por finalidade eliminar células que são lesadas de modo irreparável, limitando lesão tecidual paralela. Na seqüência de eventos do ciclo celular, essas células apoptóticas são fagocitadas por macrófagos, responsáveis pela “limpeza” dos tecidos danificados. Morfologicamente, a apoptose caracteriza-se por encolhimento celular, condensação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos. A célula em apoptose apresenta-se menor em tamanho, seu citoplasma torna-se mais denso, as organelas citoplasmáticas encontram-se compactadas e a cromatina mais condensada. Ao exame histológico, pela coloração de H&E, a célula em apoptose apresenta-se ovalada ou arredondada, com citoplasma intensamente eosinofílico e núcleo com fragmentos densos de cromatina (Evan & Vousden, 2001; Danial & Korsmeyer, 2004; Edinger & Thonpson, 2004; Kumar *et al.*, 2005a; Robbins & Cotran, 2010). O encontro de células em apoptose indica renovação do epitélio e pode representar evento natural ou resposta à agressão, uma vez que as células com danos ao DNA ou com mutações não devem sofrer mitose e se proliferar, mas sim serem induzidas à morte programada. Neste cenário de controle acirrado do ciclo celular, os genes supressores de tumores (GST) têm papel fundamental, especialmente o GST p53, considerado guardião do genoma, e responsável pela identificação de células com danos ao DNA ou com mutações (Blons & Laurent-Puig, 2003; Gascon & Crook, 2003). Quando identificadas, essas células são induzidas à interrupção do ciclo celular ou à apoptose, impedindo desta forma a perpetuação de mutações incompatíveis com o funcionamento celular. As alterações nos GST são vistas como as mais significativas na promoção da carcinogênese, sendo que as alterações no GST p53 estão presentes em 33 a 76% dos cânceres orais (Weinberg, 2008). Estando prejudicado esse importante meio de

vigilância tumoral, muitas células mutadas e cancerígenas conseguem se proliferar dando origem às neoplasias.

Para alguns autores o índice de apoptose pode ser indicativo do grau de agressividade tumoral. Indicadores histológicos de proliferação e morte celular têm sido utilizados como ferramentas importantes no diagnóstico e prognóstico de lesões orais. Jain *et al.* (2009) avaliaram o índice de apoptose em lesões pré-neoplásicas de células escamosas da cavidade oral e constataram valores mais elevados desses índices nas displasias e carcinomas escamosos bem diferenciados; contrariamente, observaram diminuição desses índices nos carcinomas indiferenciados e mais agressivos, indicando que nesses tumores de pior prognóstico, as células cancerígenas “driblam” a via da apoptose e continuam se multiplicando desenfreadamente.

A continuidade da exposição aos agentes carcinogênicos pode levar ao crescimento desordenado das células das camadas epiteliais basais e apicais dando origem às displasias (Jaber *et al.*, 1999; Lentsch & Myers, 2010). As displasias epiteliais foram registradas neste estudo tanto nas biópsias de faringe como de língua, sendo discretamente mais evidentes nos grupos GII e GIII. Ressalta-se o encontro de um caso de displasia severa em uma biópsia de faringe de um animal de GIII (expostos ao tabagismo) e em três biópsias de língua de animais de GII (expostos ao etilismo) e em dois animais de GIV (expostos simultaneamente ao tabagismo e etilismo), correspondendo ao *carcinoma in situ*. Ao contrário dos demais parâmetros histológicos estudados, a apoptose e a displasia epitelial não foram evidenciadas em nenhum animal do grupo controle. Fato curioso e intrigante foi que essas lesões mais preocupantes não foram identificadas nos exames macroscópicos, não sendo constatada nenhuma área de leucoplasia, eritroplasia ou ulceração nos fragmentos removidos em língua e faringe.

Displasia epitelial da mucosa oral constitui uma série de alterações histológicas relacionada à capacidade de malignização do epitélio escamoso como: estratificação irregular, perda da polaridade das células das camadas basais, figuras epiteliais anormais, aumento do número de mitoses, mitoses anormais, queratinização prematura das células, pérolas de queratina, variações anormais do tamanho e da forma nuclear, variações anormais do tamanho e da forma celular, aumento da proporção núcleo/citoplasma, aumento do tamanho nuclear, mitoses atípicas, hiperchromatismo e aumento do número ou tamanho do nucléolo (Bouquota *et al.*, 2006; Aguirre & Aguirre, 2008; Robbins & Cotran, 2010). Nas displasias leves as alterações epiteliais limitam-se às camadas basais; nas moderadas envolvem até dois terços do epitélio e nas graves estão presentes em mais de dois terços ou em todo o epitélio (Robbins & Cotran, 2010).

Clinicamente as áreas de displasia podem ser apresentadas como leucoplasias, liquem plano ou eritroplasias, sendo todas consideradas sinais de alerta, merecendo monitoramento constante, especialmente em pacientes fumantes e etilistas crônicos. Pacientes com displasias epiteliais apresentam riscos cinco vezes maiores de desenvolver carcinoma espinocelular do que aqueles que não as apresentam (Kramer *et al.*, 1978; Aguirre & Aguirre, 2008). Entretanto, deve-se considerar que a presença de displasia não é sinônimo de malignização e essa lesão pode ser diagnosticada mesmo na população mais jovem. Morger *et al.* (2010), avaliaram a saúde bucal de uma população, procurando determinar os fatores de risco relacionados às possíveis lesões orais em adultos jovens entre 17 e 24 anos de idade. Analisaram as respostas de um questionário, seguido de exame bucal de 615 pacientes, sendo identificadas 468 lesões, das quais 445 (95,09%) foram classificadas como condições comuns (pequenas alterações de tecidos moles, variações anatômicas, etc). Nos pacientes que apresentaram lesões mais preocupantes, os autores constataram

porcentagem elevada de fumantes e de consumidores de álcool, sendo registradas oito lesões leucoplásicas.

Em interessante revisão da literatura, Proia *et al.* (2006) reportaram que o uso do tabaco afeta principalmente a superfície do epitélio oral, gerando mudanças que podem abranger tanto aumento na pigmentação, como espessamento das camadas celulares e do estrato córneo (hiperceratose), resultando em leucoplasia. Alvarez Gómez *et al.* (2008) registraram as principais alterações histológicas encontradas em 48 biópsias de cavidade oral de pacientes fumantes, destacando-se: hiperkeratose, células inflamatórias, fibrose submucosa oral, displasia epitelial, carcinoma de células escamosas e um carcinoma *in situ*. Os autores salientam que a severidade das lesões relaciona-se com diversos fatores, entre eles predisposição genética e dieta, além dos agentes químicos dos componentes do cigarro. Jaber *et al.* (1999) confirmaram o papel nocivo do tabaco e do álcool durante estudo de 630 pacientes portadores de displasia de mucosas orais, constatando que estas lesões estavam relacionadas diretamente ao consumo excessivo de cigarros/dia (acima de 20 unidades) e à ingestão de bebidas alcoólicas.

Pelo exposto, nota-se que a literatura é vasta em demonstrar as evidências da participação do álcool e do tabaco no desenvolvimento de displasias orais, entretanto, o papel do tabaco parece ser mais notório que o do álcool, quando investigados isoladamente. Hosni *et al.* (2009), estudando os fatores de risco relacionados às leucoplásias e eritroplasias em 13 pacientes, constataram prevalência de idade acima de 57 anos, predileção pelo palato mole (77% dos casos), tabagismo e etilismo em 100 e 46% dos casos, respectivamente. Em revisão sistemática sobre os fatores de riscos relacionados ao carcinoma de cabeça e pescoço, Hashibe *et al.* (2007) incluíram 10.244 pacientes portadores de CEC de 15 estudos, dos quais 1.072 não eram

fumantes e 1.598 não era etilistas; os demais apresentavam associação de ambos os hábitos. Entre os não alcoólicos o cigarro representou importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer, estando diretamente relacionado ao número, frequência e duração do hábito. Entre os que nunca fumaram, o risco de câncer esteve presente apenas nos consumidores de altas doses. Esse resultado induz-nos a raciocinar sobre o maior risco do tabagismo para o desenvolvimento do câncer, quando comparado ao etilismo.

Resultados interessantes em pesquisas experimentais relacionadas aos componentes do cigarro foram também apresentados na literatura, mesmo com tempo de exposição muito pequeno. Tomassini *et al.*(2007), administraram nicotina na água de beber de ratos durante apenas três semanas e observaram alterações importantes no diâmetro das papilas fungiformes, sem que houvesse alteração no número total delas na superfície da língua.

A ação do tabaco parece ser mais relevante, porém sua associação com o álcool potencializa os riscos relacionados ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. Rooban *et al.*(2009) avaliando a prevalência de lesões na mucosa oral em 500 usuários abusivos de álcool, examinados durante um período de dois anos, observaram melanose, fibrose submucosa oral e leucoplasia (10,2%, 8% e 7,4% respectivamente), sendo que deste total, 76% dos que apresentaram lesões eram tabagistas, concluindo que o risco de desenvolver lesões aumenta com a intensidade e frequência do uso de tabaco, associado ao uso abusivo de álcool.

A exata fisiopatologia dos eventos relacionados ao processo da carcinogênese é muito discutida na literatura e parece seguir três modelos principais: aditivo, exponencial ou sinérgico. No modelo aditivo os efeitos nocivos de cada agente são somados independentemente; no exponencial esses efeitos são multiplicados e no

sinérgico os efeitos são produzidos como consequência da ação de ambos os fatores conjuntamente (Gigliotti *et al.*, 2008). O efeito sinérgico entre álcool e tabaco pode ser facilmente reconhecido pela ação vasodilatadora do etanol, responsável pelo aumento da permeabilidade da mucosa, facilitando a passagem de agentes carcinógenos derivados do tabaco para a célula, causando lesões no DNA. A ação sinérgica do álcool é também representada pela sua atuação como solvente, aumentando a permeabilidade celular à penetração dos agentes cancerígenos para as mucosas (Blot, 1992; Fernandes *et al.*, 2007). Deve-se considerar também que as bebidas alcoólicas possuem diversos agentes carcinogênicos, destacando-se: componentes aromáticos, alcalóides, N-nitrosamina, hidrocarbonetos policíclicos, micotoxinas, uretano, tanino, entre outros. No entanto, o acetaldeído, principal metabólito do etanol, parece ser o importante precursor das neoplasias. O metabolismo do etanol a acetaldeído é realizado no fígado por três enzimas: álcool desidrogenase (ADH), catalase e o sistema microsomal de oxidação do etanol (SMOE) que essencialmente parte do citocromo P450. Em seguida, o acetaldeído é oxidado a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e depois em acetil – CoA. A indução das enzimas de metabolização do citocromo P-450 pelo etanol pode aumentar a ativação metabólica de agentes carcinógenos, bem como o estresse oxidativo, precursores de neoplasias (Fernandes *et al.*, 2007). Além dessas vias, o álcool, por ação indireta, pode provocar atrofia das mucosas orais e das glândulas salivares e, conseqüentemente, diminuição da secreção salivar, resultando na diminuição da limpeza oral e aumento local da concentração de substâncias pro-carcinogênicas e carcinógenos. O álcool fornece muitas calorias o que desmotiva a ingestão de alimentos mais saudáveis, levando a deficiências nutricionais, hipovitaminoses, especialmente a hipovitaminose A. O alcoolismo parece alterar também as funções hepáticas e o sistema imunológico, favorecendo ainda a ativação de pró-carcinógenos e aumento do

acetaldeído, pela maior atividade da enzima álcool desidrogenase ou diminuição da aldeído desidrogenase (Wight & Ogden, 1998; Blot, 1992; Franco *et al.*, 1989; Seitz *et al.*, 2001; Figuero-Ruiz *et al.*, 2004; Purohit *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2007). A atrofia das mucosas provocadas pelo álcool não se restringe à mucosa oral, estendendo-se também à laringe. Maier *et al.* (1999), durante exposição de ratos à ingestão de dietas contendo etanol por seis meses observaram significativa redução na espessura do epitélio glótico, especialmente próximo às comissuras anteriores e posteriores, sugerindo susceptibilidade desse epitélio à ação de agentes carcinogênicos, mesmo sem haver contato direto com essas substâncias.

Além dos mecanismos acima apresentados, Figuero-Ruiz *et al.* (2004), em extensa revisão sobre os mecanismos de ação do álcool, incluíram ainda a participação da microflora bacteriana na oxidação do etanol, sendo produzida grande quantidade de acetaldeído durante o consumo de bebidas alcoólicas, especialmente em sujeitos com predomínio da flora aeróbica oral (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* sp., *Stomatococcus* sp.), sendo o processo dose dependente.

O potencial carcinogênico do álcool está diretamente relacionado à concentração de etanol nas bebidas destiladas, ao número de doses diárias e ao tempo do vício (Huang *et al.*, 2003; Aguirre & Aguirre, 2008). Estudos experimentais utilizando etanol demonstraram resultados interessantes. Kassis *et al.* (2007), em modelo de carcinogênese no qual ratas *Wistar* lactantes ingeriram etanol na concentração de 20%, durante 21 dias, constataram diminuição significativa do peso corporal de seus filhotes e hipotrofia das células epiteliais palatinas, reflexo da toxicidade do etanol em todo o organismo. Outros estudos experimentais em animais registraram proliferação de células epiteliais em mucosa oral após exposição crônica ao álcool durante seis e 12

meses, corroborando com os resultados deste estudo. (Maito *et al.*, 2003; Carrard *et al.*, 2008).

Taybos (2003) resumiu as principais alterações orais observadas em pacientes fumantes crônicos, destacando aumento na pigmentação das mucosas; espessamento do epitélio (hiperceratose), podendo ser vista como lesão branca ao exame clínico; aumento de número de doenças periodontais e de cáries; manchas melânicas (melanose do fumante), que acometem 5 a 21,5% dos casos, produzidas pelo estímulo dos melanócitos a partir dos componentes irritativos do cigarro; estomatite nicotínica, mais freqüente em palato e caracterizada como mancha avermelhada; língua pilosa negra, secundária ao crescimento das papilas filiformes a partir de sua queratinização exagerada, sendo recoberta por pigmentos de nicotina.

Neste estudo, em algumas biópsias de língua e de faringe foram detectadas displasias graves, consideradas carcinoma *in situ*. Essas lesões podem se transformar em carcinoma em 4 a 18% dos casos (Alvarez-Gomez *et al.*, 2008; Rooban *et al.*, 2009). Lesões potencialmente malignas se desenvolvem pelo contato com os componentes irritativos do tabaco, os quais uma vez absorvidos, passam a interferir na replicação do DNA. O CEC corresponde a mais de 90% dos casos (Lentsch & Myers, 2010). Para Reibel (2003) o tipo de tabaco não é relevante na gênese das lesões orais, mas sim a quantidade inalada, facilitando os efeitos das substâncias do cigarro na indução de mutações no DNA. O sinergismo entre o tabaco e o álcool tem sido estimado em 75 a 90% de todos os tipos de câncer e teorias para explicar este fato apóiam o aumento da permeabilidade do epitélio oral, ficando este mais sensível aos efeitos deletérios do tabaco.

Neste estudo, especificamente nos grupos de animais expostos à inalação da fumaça de cigarro (grupos III e IV), a metodologia utilizada possibilitou a

sensibilização pelo agente apenas durante 30 minutos ao dia, mimetizando uma exposição aguda. Apesar desse curto período de exposição, a cronificação do processo ao longo dos 260 dias do experimento, ratificou a obtenção dos maiores índices de alterações displásicas no grupo III (tabaco), especialmente nas biópsias de faringe. Ressalta-se que mesmo nesses casos, a identificação macroscópica dessas lesões não foi possível, o que reforça a importância do estudo histológico por meio de biópsias.

Frente às considerações apontadas, seria esperadol que neste estudo as alterações histológicas mais marcantes fossem registradas nos animais de GIV, expostos simultaneamente ao tabagismo e ao etilismo, o que não ocorreu, uma vez que as análises estatísticas dos resultados histológicos não determinaram diferenças significativas entre os grupos expostos aos agentes, diferindo-se apenas dos animais do grupo controle. Acredita-se que resultados mais expressivos poderiam ser obtidos com aumento do tempo de exposição aos agentes agressores, especialmente à inalação de fumaça de cigarro.

Finalmente, ressalta-se que o desenvolvimento das neoplasias depende da interação de diversos fatores ambientais (considerados carcinogênicos ou cancerígenos) e fatores relacionados ao hospedeiro (idade, raça, sexo, mutações espontâneas e herdadas). Na grande maioria dos cânceres, as mutações verificadas são causadas espontaneamente ou induzidas por fatores ambientais. Aproximadamente 80% das neoplasias estão relacionadas direta ou indiretamente aos agentes extrínsecos ou ambientais com potencial mutagênico, nos quais o álcool e o tabaco se enquadram. Salienta-se a participação de outros fatores de risco para o desenvolvimento do câncer das vias aéreas como a exposição ocupacional a substâncias carcinogênicas como fumaça de cromatos, pigmentos, pó de algodão, pesticidas, pó de madeira, dietas pobres

em frutas, verduras e legumes, exposição à vírus oncogênicos, imunodeficiência e higiene bucal inadequada.(Stopelli & Crestana; Oliveira *et al.*,2008)

Indubitavelmente, a associação entre álcool e tabaco está presente em 65 a 90% dos pacientes com câncer bucal. Os riscos são proporcionais ao tempo de consumo durante a vida e ao número de cigarros consumidos ao dia. Esses riscos se estendem também aos fumantes passivos (Okoli *et al.*,2007).

6 CONCLUSÃO

A ingestão crônica de etanol e a exposição à fumaça de cigarro de ratos mantidos nas condições experimentais deste estudo durante 260 dias determinaram lesões importantes nas mucosas de língua e da faringe, as quais variaram desde eventos benignos como hiperplasias de células epiteliais, hiperkeratose e inflamação, até alterações mais relevantes como displasias de diversos graus, incluído o carcinoma *in situ*. Esses resultados demonstram os efeitos deletéricos do álcool e do tabaco sobre as mucosas da língua e da faringe.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Aguirre EP, Aguirre UJM. Displasia epitelial. Concepto y significacion. Av Odontoestomatol. 2008;24(1):81-84.

Alvarenga LM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. Rev Bras Otorrinolaringol. 2008;74(1):68-73.

Alvarez Gómez GJ, Alvarez Martínez E, Jiménez Gómez R, Mosquera Silva Y, Gaviria Núñez AM, Garcés Agudelo A, Alonso Duque A, et al. Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13:1-8.

Amorim FSF, Sobrinho JA, Rapoport A, Carvalho MB, Novo NF, Juliano Y. Estudo de variáveis demográficas, ocupacionais e co-carcinogênicas no carcinoma espino celular da base de língua nas mulheres. Rev Bras Otorrinolaringol. 2003;69(4):472-8.

Antunes JL, Biazevic MG, de Araujo ME, Tomita NE, Chinellato LE, Narvai PC. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil, 1980-1998. Oral Oncol. 2001;37(4):345-50.

Banoczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1976;42(6):766-74.

Baykul T, Yilmaz HA, Aydin U, Audin MA, Aksoy M, Yildim D. Early diagnosis of oral cancer. J Int Med Res. 2010;38(3):737-49.

Berto JC, Rapoport A, Lehn CN, Cestari-Filho GAF, Javaroni AC. Relação entre o estadiamento, o tratamento e a sobrevida no câncer de faringe. Rev Col Bras. Cir 2006;33(4):207-210.

Binns R. Animal inhalation studies with tobacco smoke. Rev Environ Health. 1975;2(2):81-116.

Blons H, Laurent-Puig P. TP53 and head and neck neoplasms. *Hum mutation*. 2003;21:252-7.

Blot WJ. Alcohol and Cancer. *Cancer Research*. 1992;52:2119-23.

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7(2):149-56.

Borrell AG, Luiz MN, González AMG. Mortalidad por tumor maligno de la cavidad bucal y la farinag. Cuba, 1968-1987. *Rev Cubana Salud Pub*. 1990;16:151-65.

Bouquota JE, Speightb PM, Farthingb PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa- Diagnostic problems and prognostic features. *Current Diagnostic Pathology*. 2006;12:11-21.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal- Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal, Brasília: Ministério da Saúde, 2004a [acesso 01 março 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/politica_nacional_brasil_sorridente.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância [Internet]. Prevalência de Tabagismo no Brasil - Dados dos inquéritos epidemiológico em capitais brasileiras, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2004b [acesso 17 fevereiro 2010]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/.../tabaco_inquerito_nacional_070504.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde, 2007. [acesso 17 fevereiro 2010]. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_padroes_consumo_alcool.pdf.

Brunetti, RF, Montenegro, FLB. *Odontogeriatria: noções de interesse clínico*. São Paulo: Artes Médicas; 2002.

Brunin F, Mosseri V, Jaulerry C, Point D, Cosset M, Rodriguez J. Cancer of the base of the tongue: past and future. *Head Neck*. 1999;21(8):751-9.

Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Sant'ana Filho M. Álcool e câncer bucal: considerações sobre os mecanismos relacionados. *Rev Bras Cancer*. 2008;54(1):49-56.

Carvalho MB, Lenz J, Lehn CN, Fava AS, Amar A, Kanda JL et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Ass Med Brasil*. 2001;7(43):208-14.

Chen YP, Johnson GK, Squier CA. Effects of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on hamster cheek pouch and gastric mucosa. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(6):251-5.

Cedeño F, Finol HJ. Ultrastructural Pathology of Inflammatory Infiltrate in epithelial dysplasia and oral Spinocellular Carcinoma. *Acta Odontol Venez* 2008;46(4):1-4.

Coelho, CMP, Zucoloto, S. Hiperplasia fibro-epitelial inflamatória da cavidade oral. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1998;52(5):383-87.

Coggins CR. A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke, in hamsters, dogs, and nonhuman primates. *Toxicol Pathol*. 2001;29(5):550-7.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116-205.

Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck*. 2001;23(4):273-9.

Dontenwill W, Chevalier HJ, Harke HP, Lafrenz U, Reckzeh G, Schneider B. J Investigations on the effects of chronic cigarette smoke inhalation in Syrian golden hamsters. *Natl Cancer Inst*. 1973;51:1781-1832.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:663.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411:342.

Fant RV, Henningfield JE Pharmacology and Abuse Potential of Cigars. In: NATIONAL CANCER INSTITUTE. Smoking and tobacco control Monographs – Cigars: Health Effects and Trends. 1998 [acesso 17 fevereiro 2010]. Disponível em:<http://cancercontrol.cancer.gov/tcrb/monographs/9/index.html>.

Fardin M, Abrão R, Amar A, Magalhães MR, Latorre MRDO. Fatores de risco no prognóstico do câncer da boca. Estudo de 1440 casos. Rev Bras Cir Cab Pesc. 2004;33(1):27-33.

Fernandes LA, Crivelini MM. Presença de *Candida sp* em leucoplasias da mucosa bucal. Rev Fac Odontol 2004;16(2):25-32.

Fernandes JP, Brandão VSG, Lima AAS. Prevalência de lesões cancerizáveis bucais em indivíduos portadores de alcoolismo. Rev Bras Cancer. 2007;54(3):239-244.

Figlie NB, Bordin S, Laranjeira R. Aconselhamento em Dependência Química. São Paulo: Roca; 2004.

Figuero-Ruiz E, Carretero- Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza- Gómez GC, Moreno-López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. Med Oral. 2004;9:14-23.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. Int J Cancer. 1989;43(6):992-1000.

Freita VS, Lopes MA, Meireles JRC, Reis L, Cerqueira EMM. Efeitos genotóxicos de fatores de risco para o câncer bucal. Rev Baiana de Saúde Publica. 2005;29(2):189-99.

Gascon M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. Oral oncol. 2003;39:222-31.

Gigliotti MP, Tolentino ES, Tomita NE, Chinellato LEM. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. Odontol Clín Científ. 2008;7(2):107-112.

Gordon-Nuñez MA, Silva Júnior FL, Lucena HF, Galvão HC, De Souza LB, Pinto LP. Clinical and Histomorphological Analysis of Normal Oral Mucosa, Oral Inflammatory Hyperplasia and Oral Epithelial Displasia. Int J Morphol. 2008;26(2):345-352.

Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. Eur J Cancer Prev. 2010;19(6):431-65.

Graham S, Dayal H, Rohner T, Swanson M, Sultz H, Shedd D, et al. Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1977;59(6):1611-618.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Tham M. Cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2001;51:15-36.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras de Cancerol.* 2005;51(3):227-34.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the internacional head and neck cancer epidemiology consortium. *JNCI.* 2007;99:77-89.

Hecht SS. Carcinogenicity studies of inhaled cigarette smoke in laboratory animals: old and new. *Carcinogenesis.* 2005;26:1488-92.

Hosni E S, Salum FG, Cherubini K, Yurgel LS, Figueiredo MAS. Eritroplasia e leucoeritroplasia oral: análise retrospectiva de 13 casos. *Braz J Otorrinolaryngol.* 2009;75:295-99.

Huang WY, Winn DM, Brown LM, Gridley G, Bravo-Otero E, Diehl SR, et al. Alcohol concentration and risk of oral cancer in Puerto Rico. *Am J Epidemiol.* 2003;157:881-87.

Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Reviews.* 2005;57(1):79-115.

Hutt JA, Vuilleminot BR, Barr EB, Grimes MJ, Hahn FF, Hobbs CHA, et al. Life-span inhalation exposure to mainstream cigarette smoke induces lung cancer in B6C3F1 mice through genetic and epigenetic pathways. *Carcinogenesis.* 2005;26(11):1999-2009.

Instituto Nacional do Câncer [internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2009. [acesso 21 fevereiro 2010]. disponível em:[http:// www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional por amostras de domicílios Rio de Janeiro:IBGE;1998.

Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia - the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol.* 1999;35(2):151-6.

Jain A, Maheshwari V, Alam K, Mehdi G, Sharma SC. Apoptosis in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity. A light microscopic study. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52:164-66.

Kassis EN, Asoubel R, Lopes RA, Martins AT, Di Matteo MAS, Gawlinski VC. Histometric study of the epithelium of rats submitted to ethanol during lactation. *Int J Morphol.* 2007;25(4):755-61.

Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrate DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 2006;387:365-72.

Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46(4):518-39.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Adaptação, Dano e Morte Celular. In: *Patologia: bases patológicas das doenças: Robbins & Cotran. 7.ed.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2005a. p.3-48.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação aguda e crônica. In: *Patologia: bases patológicas das doenças: Robbins & Cotran. 7.ed.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2005b. p. 49-89.

Lei Antifumo, nº 13.541, de 7 de Maio de 2009. acesso em: [17 de fevereiro de 2010]. disponível em: <http://www.leiantifumo.sp.gov.br/usr/share/documents/legislacao.pdf>.

Lentsch EJ, Myers JN. Pathogenesis and Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. In: *Cancer of the Head and Neck. Myers EN, Suen JY, Myers JN, Hanna EY. 4ª ed.* Philadelphia; Saunders; 2010.p.5-28.

Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, Rutqvist LE. Smoking tobacco, oral snuff and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a populational-based case referent study in Sweden. *Cancer.* 1998;82:1367-75.

Lopes A, Iyeayasu H, Castro, RMRPS. Oncologia para a graduação. 2ª ed. São Paulo: Tecmedd; 2008. p.xxi-xxiii.

Maier H, Tisch M, Schneeberg E, Born A. An association of chronic alcohol consumption with morphological alterations of the laryngeal mucosa in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1999;256(5):247-9.

Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol.* 2003;31(1):25-30.

Martin-Granizo R , Rodriguez-Campo F , Naval L , Gonzales FD. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(3): 268-75.

Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(4):489-501.

Mathew Iype E, Pandey M, Mathew A, Thomas G, Sebastian P, Nair MK. Squamous cell carcinoma of the tongue among young Indian adults. *Neoplasma.* 2001;3(4):273-7.

Mauderly JL, Gigliotti AP, Barr EB, Bechtold WE, Belinsky SA, Hahn FF, Hobbs CA, March TH, Seilkop SK, Finch GL. Chronic inhalation exposure to mainstream cigarette smoke increases lung and nasal tumor incidence in rats. *Toxicol Sci.* 2004;81:280-92.

Minicucci EM, Ribeiro DA, da Silva GN, Pardini MI, Montovani JC, Salvadori DM. The role of the TP 53 gene during rat tongue cacinogenesis induced by 4-nitroquinoline1-oxide. *Exp Toxicol Pathol* 2010. *in press.*

Morger R, Ramseier CA, Rees TD, Bürgin WB, Bornstein MM. Oral mucosal findings related to tobacco use and alcohol consumption: a study on Swiss army recruits involving self-reported and clinical data. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(2):143-51.

Musk AW, de Klerk NH. History of Tobacco and Health. *Respirology.* 2003;8(3):286-90.

Nason RW, Anderson B J, Gujrathi DS, Abdoh AA, Cooke, RC. A retrospective 70 comparison of treatment outcome in the posterior and anterior tongue. *Am J Surg* 1996;172(6):665-70.

Navarro CM, Almeida OP, Line SRP. Carcinogênese experimental: lesões palatinas e linguais produzidas pelo óxido de nitroquinolina (4NOO) em ratos. Rev Odontol.UNESP 1994; 23(1):71-80.

Neville BW, Damm DD, Allen CM Patologia Oral e Maxilofacial. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan;1998.

Okoli CTC, Kelly T, Hahn EJ. Secondhand smoke and nicotine exposure: A brief review. Addictive Behaviors. 2007;32:1977-88.

Oliveira JC, Moreira MAR, Martins E, Silva CMB, Mineiro MS, Souza EC, Curado MP. A exposição ocupacional como fator de risco no câncer de cavidade oral e orofaringe no Estado de Goiás. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço. 2008;37(2):82-87.

Oliveira LR, Silva AR, Zucoloto S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. J Bras Patol Med Lab. 2006;42:385-92

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campanha AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. Arq Bras Cardiol. 2003;8(3), 221-4.

Papageorge MB, Cataldo E, Jahngen EG. The effect of N-nitrosornicotine on the buccal mucosa of Syrian hamsters. Oral Maxillofac Surg. 1996;54(2):187-90.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.

Perussi MR, Denardin OVP, Fava AS, Rapoport A. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. Rev Assoc Med Bras. 2002;48(4):341-4.

Pithan SA, Cherubini K, Figueiredo MAZ, Yurgel LS. Perfil epidemiológico do carcinoma espinocelular de boca em pacientes do serviço de estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Rev Odonto Cienc. 2004;19(44):126-130.

Purohit V, Khalsa J, SerranoJ. Mechanisms of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium. Alcohol. 2005;35:155-60.

Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer-a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1061-77.

Reibel J, Tobacco and Oral Diseases. *Med Princ Pract.* 2003;12:22-32.

Ribeiro DA, Salvadori DM. Gingival changes in wistar rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Eur J Dent.* 2007; 1(3):152-7.

Robbins SL, Cotran RS. *Pathologic Basis of Disease.* 8.ed. Philadelphia: Elsevier; 2010.

Rooban T, Rao A, Joshua E, Ranganathan K. The prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in Chennai, South India. *Indian J Dent Res.* 2009;20: 41-6.

Routh HB, Bhowmik KR, Parish JL, Parish LC. Historical Aspects of Tobacco Use and Smoking—Two Surgeons General. *Clinic in Dermatol* 1998;16(5):539–44.

Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. *Arq. Cienc. Saude.* 2006;13(1):34-38.

Sarini J, Fournier C, Levebvre JL, Bonafos G, Van JT, Coche-Dequeant B. Head and neck squamous cell carcinoma in elderly patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:1089-92.

Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(5):137-143.

Siegelmann-Danieli N, Hanlon A, Ridge JA, Padmore R, Fein DA , Langer CJ. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *J Clin Oncol* 1998;16(2):745-53.

Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 1994;21(3):281-8.

Spolidorio LC, Martins VRG, Nogueira RD, Spolidorio DMP. Frequencia de *Candida sp* em biópsias de lesões da mucosa oral. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(1)89-93.

-
- Stopelli, IMBS; Crestana, S. Pesticide exposure and cancer among rural Workers from Bariri, São Paulo State, Brazil. *Environment Internacional*. 2005;31(5):731-38.
- Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In *Patologia-Bases Patológicas das Doenças.*(Robin & Contran.) 8ª ed. São Paulo. Elsevier. 2010.p.259-330.
- Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci*. 2003;326(4):179-82.
- Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(10).
- Tomassini S, Cuoghi V, Catalani E, Casini G, Bigiani A. Long-term effects of nicotine on rat fungiform taste buds. *Neuroscience*. 2007;13;147(3):803-10.
- Tutka P, Mosiewics J, Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*. 2005;57:143:53.
- Van der Waal I, Schepman, KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol*. 1997;33(5):291-301.
- Walker EA, Castegnaro M, Garren L, Toussaint G, Kowalski B. Intake of volatile nitrosamines from consumption of alcohols. *J Natl Cancer Inst*. 1979; 63(4):947-51.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008;3:127-33.
- Weinberg RA. *A biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed; 2008. p.307-56.
- Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer—a review. *Oral Oncol*. 1998;34(6):441-47.
- Witschi H. Tobacco smoke-induced lung cancer in animals-a challenge to toxicology ? *Int J Toxicol*. 2007;26(4):339-44.

Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(4):299-305.

8 ANEXO - A Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

unesp  **Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 12 de fevereiro de 2.009 OF. 003/2009-CEEA

Ilustríssima Senhora
Prof^a Dr^a Regina Helena Garcia Martins
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e CCP
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Dr^a Regina,

Informo que foi dada ciência aos membros da CEEA em reunião de 12/02/2009 sobre a existência e realização do **Sub-Projeto** abaixo discriminado, que faz parte do Projeto de Pesquisa **"Avaliação morfofuncionais, bioquímicos e imunohistoquímicos em ratos expostos ao tabagismo e etilismo" - Protocolo CEEA 698-2008 aprovado em 25/09/2008.**

Sub-Projeto I: Efeitos do tabagismo e do etilismo crônico nas mucosas da língua e da faringe. Estudo histológico e imuno-histoquímico da proteína P53 em ratos" - Autor: Sérgio Luiz Marques Madeira - Orientador: Prof^a Dr^a Regina Helena Garcia Martins (aprovado pela CEEA em 12/02/09- Protocolo 698-2008-A)

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA.