

**PIETRO MAINENTI**

**CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA POR  
DMBA EM GLÂNDULAS SALIVARES SUBMANDIBULARES  
DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.**

**PIETRO MAINENTI**

**CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA POR  
DMBA EM GLÂNDULAS SALIVARES SUBMANDIBULARES  
DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa**

**São José dos Campos  
2006**

Não posso dizer que cheguei ao meu destino.  
Também não digo, simplesmente, que este é o começo.  
O que sei é que o caminho é o mesmo de sempre.  
Mas a partir de hoje, de agora,  
enxergo com mais clareza o que existe à minha frente.  
Acredito mais na direção e menos no tempo,  
contemplando o que de bom meu caminho me oferece.

Pietro Mainenti  
17-05-06

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais, **ANTONIO e GLADYS**, pelo apoio irrestrito e constante em todos os meus projetos de vida. Sua presença abnegada e conforto emocional sempre estiveram ao meu alcance nos primeiros sinais de necessidade e fraqueza. Obrigado.*

*Às minhas irmãs, **SANDRA e LUISELLA**, que sempre me incentivaram a continuar minha formação acadêmica. Agradeço pelos conselhos e, também, pelo amor e carinho sempre presentes.*

*Ao meu tio **IVERSON**, pela sua presença cada vez mais constante.*

*À minha namorada **PATRÍCIA**, pelo apoio à minha jornada acadêmica. Agradeço a você por estar ao meu lado nesta caminhada.*

*Aos meus padrinhos **ADÉLIA e FERNANDO**, por toda torcida pelas minhas conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Prof. Adjunto **LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA**,  
academicamente meu orientador, meu mestre.*

*Sempre presente, zeloso e disponível para o trabalho a ser realizado.*

*Na vida real, meu amigo.*

*Pessoa sensível e leal.*

*Simplesmente agradeço.*

*Prof<sup>a</sup>. Adjunta **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**,  
por ter me acolhido quando da minha chegada à UNESP.*

*Por festejar meu sucesso mas também por apontar meus erros.*

*Muito obrigado.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. PAULO VILELA SANTOS JÚNIOR, por possibilitar a realização desse mestrado.*

*À Prof. Adjunta YASMIN RODARTE CARVALHO, pelas sugestões, auxílios e colaboração durante a realização deste curso.*

*Á Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO, pela orientação sempre acolhedora.*

*Às técnicas de laboratório MARIA SALETE FARIA e ANA LOURDES DA SILVA MACHADO, pelo esmero no preparo do material histológico.*

*Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, ROSEMARY DE FÁTIMA SALGADO, ERENA MICHIE HASEGAWA e MARIA APARECIDA CONSIGLIO DE SOUZA, pela atenção e disponibilidade.*

*À bibliotecária ÂNGELA DE BRITO BELLINI, pela disponibilidade e paciência na revisão deste estudo.*

*Aos funcionários do Biotério, **LOURIVAL JACOB e ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELOS** pela colaboração na fase experimental desta pesquisa.*

*Aos **ANIMAIS EXPERIMENTAIS** cujas vidas foram sacrificadas em benefício do progresso da ciência, a eles o meu profundo respeito.*

*A todos os **COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** pelo agradável convívio e pela colaboração direta ou indireta na realização deste estudo. Em especial, **FERNANDO AUGUSTO CERVANTES GARCIA DE SOUSA, FLÁVIA CELINA SGARBI, MÔNICA DAL PIAN NOBRE, RODRIGO DIAS NASCIMENTO, ELAINE DIAS DO CARMO, ANDRESA DA COSTA PEREIRA, VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA.***

*À amiga **ANGELA BOLANHO**, que me inspirou no tema deste trabalho. Sou muito grato por sua paciência e dedicação em me auxiliar nas várias fases desta pesquisa.*

*Às amigas **GISELLE SEGNINI SENRA e CRISTINA WERKMAN** que, cada uma à sua maneira, contribuíram para a realização deste trabalho experimental.*

*Aos amigos e colegas cirurgiões  
bucamaxilofaciais **GUSTAVO SAGGIORO OLIVEIRA,**  
**HERBERT MENDES MORAES** e **GLADSON DE SOUZA**  
**GURGEL**, pelo suporte dado aos meus pacientes e aos meus  
plantões hospitalares em Juiz de Fora (MG).*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO .....	12
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 Carcinogênese .....	15
2.2 Carcinogênese química .....	20
2.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .....	21
2.4 Modelos animais para carcinogênese química em glândulas salivares.....	23
2.5 Carcinogênese experimental em glândulas salivares animais.....	28
2.6 Respostas do hospedeiro às neoplasias induzidas quimicamente .....	36
2.7 Neoplasias de glândulas salivares em humanos.....	37
2.7.1 Carcinoma de células escamosas .....	37
2.7.2 Sarcomas .....	38
2.7.3 Carcinossarcomas.....	39
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO .....	42
4.1 Preparação dos animais .....	43
4.2 Análise histológica .....	45
4.3.Documentação fotográfica .....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Aspectos clínicos.....	47
5.1.1 Quinta semana .....	48
5.1.2 Décima semana .....	48
5.1.3 Décima quinta semana. ....	49
5.1.4 Décima oitava semana .....	50
5.1.5 Décima nona semana.....	51
5.1.6 Vigésima semana .....	51

5.2 Macroscopia das peças cirúrgicas .....	52
5.3 Aspectos histopatológicos .....	54
5.3.1 Quinta semana .....	54
5.3.2 Décima semana .....	57
5.3.3 Décima quinta semana .....	62
5.3.4 Décima oitava semana .....	66
5.3.5 Décima nona semana .....	67
5.3.6 Vigésima semana .....	67
6 DISCUSSÃO .....	71
7 CONCLUSÃO .....	82
8 REFERÊNCIAS .....	84
ANEXOS .....	92
<i>ABSTRACT</i> .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cm	Centímetro
CYP1A1	Gene que codifica enzima de detoxificação da família do citocromo CYP
CYP1B1	Gene que codifica enzima de detoxificação da família do citocromo CYP
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno ou 9,10-dimetil 1,2-benzantraceno
DNA	do inglês “Desoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico
EGF	do inglês “Epidermal Growth Factor”, traduzido como fator de crescimento epidérmico
FGF	do inglês “Fibroblast Growth Factor”, traduzido como fator de crescimento fibroblástico
FOSJC	Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
p16	gene p16
p53	gene p53
Rb	gene do retinoblastoma
g	Gramas
H/E	Hematoxilina e Eosina
IM	intra-muscular

μl	Microlitros
μm	Micrômetro
ml	Mililitros
mg	Miligramas
mm <sup>3</sup>	milímetro cúbico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAH	do inglês “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, traduzido como Hidrocarboneto Policíclico Aromático
pH	medida da acidez de uma solução – p: potencial e h: hidrogênio
ppm	partes por milhão
PVPI	polivinil pirrolidona iodo 1%
<i>ras</i>	do inglês “ <u>ra</u> t <u>sa</u> rcoma”, traduzido como sarcoma do rato. Constitui uma família de genes identificada em vírus que causam sarcomas em ratos (H- <i>ras</i> , K- <i>ras</i> e N- <i>ras</i> )
RNA	do inglês “Ribonucleic Acid”, traduzido como ácido ribonucléico
UNESP	Universidade Estadual Paulista
%	porcentagem
Ø	diâmetro em milímetros (entre 0,35 e 0,40mm) referente a fio cirúrgico

MAINENTI, P. **Carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (*rattus norvegicus*)**.2006.94f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, área Biopatologia Bucal)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

## RESUMO

A carcinogênese consiste em um processo de alterações genéticas após contato celular com agentes físicos, químicos ou biológicos. Esta interação pode culminar em manifestações de fenótipos malignos celulares. No estudo experimental da carcinogênese em glândulas salivares animais, os autores são unânimes em apontar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) como potentes agentes carcinogênicos. O 7,12 – dimetilbenzantraceno (DMBA), pertencente ao grupo dos HPA, é considerado o carcinógeno químico de eleição para a tumorigênese de glândulas salivares animais. Este trabalho visou o estudo de DMBA injetado em glândulas salivares submandibulares de ratos. Foram utilizados 28 ratos (*Rattus norvegicus*), com três meses de idade e peso aproximado de 300g. Os animais foram divididos em quatro grupos de sete indivíduos. Após anestesia, tricotomia e anti-sepsia as glândulas submandibulares esquerdas de todos os animais foram expostas por incisão cervical anterior. Utilizando-se seringa de 1,0 ml injetou-se 0,1 ml de solução de DMBA/acetona à 2% naquelas glândulas. O plano epitelial foi suturado com seda preta 3-Ø. Ao final da 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, e 20<sup>a</sup> semanas os animais foram sacrificados utilizando-se doses letais da solução anestésica/relaxante. Os resultados revelaram, na 5<sup>a</sup> semana, sete casos de sialadenite crônica. Na 10<sup>a</sup> semana, um caso com atipia celular ductal, dois casos de carcinoma epidermóide e quatro de sialadenite crônica. Entre a 15<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semanas, foram observados três casos de hiperemia, três casos de carcinoma epidermóide, um caso de sarcoma e sete casos de carcinossarcoma. A análise dos dados, em porcentagem, revelou: 3,6% de atipia celular, 3,6% de sarcoma, 10,7% de hiperemia, 17,9% de carcinoma epidermóide, 25% de carcinossarcoma e 39,4% de sialadenite crônica. Conclusão: Os dados obtidos permitiram o estudo da história natural da carcinogênese glandular por DMBA desde os processos inflamatórios iniciais até à formação de neoplasias mesenquimais, epiteliais e mistas.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinogênese; glândulas salivares; DMBA, neoplasias.

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos de produtos industriais e do meio ambiente nos seres vivos parecem ter sido notados primeiramente no homem. No século XVI descobriu-se que mineradores das regiões européias de Schneeberg e Joachimstal encontravam-se doentes. Somente após trezentos anos tornou-se claro o quadro clínico destes mineradores. Tratava-se de câncer pulmonar, provavelmente causado por urânio e seu subproduto radônio, presentes em minas de prata e cobalto (WEISBURGER<sup>35</sup>, 1994).

No século XVIII, Percival Pott teceu observações associando o câncer de pele do escroto à atividade laborativa dos limpadores de chaminé. Hill, outro estudioso, vinculou o uso de rapé aos carcinomas nasais. Mas somente no século XX que a carcinogênese química experimental com animais de laboratório foi desenvolvida (RODRIGUES & CAMARGO<sup>24</sup>, 1999).

As descobertas advindas das observações de ocorrência de neoplasias humanas associadas às substâncias químicas e riscos ocupacionais, culminaram na descoberta dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Estas substâncias, produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis, principalmente, foram reconhecidas como compostos de considerável potencial carcinogênico (WOOLF<sup>38</sup>, 1998).

Os primeiros experimentos controlados com animais e carcinógenos químicos foram conduzidos por pesquisadores japoneses

em 1918 (SHKLAR<sup>27</sup>, 1970; EL-MOFTY<sup>8</sup>, 1977). O uso de órgãos-alvo, como as glândulas salivares, somente ocorreu em 1942, com Steiner (STANDISH<sup>28</sup>, 1957; CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964; SHKLAR<sup>27</sup>, 1970; EL-MOFTY<sup>8</sup>, 1977).

O estudo da carcinogênese quimicamente induzida em glândulas salivares tem como agente mais utilizado o DMBA (9,10-dimetil 1,2-benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno). Este composto faz parte do elenco dos HPA. Pode ser utilizado na forma de *pellet* ou na forma de solução em diferentes veículos como vaselina e acetona. Os animais pesquisados são, em sua maioria, ratos e hamsters (CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966; TURBINER et al.<sup>34</sup>, 1969; HINDY et al.<sup>17</sup>, 1995). Sumitomo et al.<sup>30</sup> (1996) realizaram experimentos, por meio de implantação, em glândulas submandibulares de ratos, de esponja embebida em DMBA a 1%.

Existe uma marcada discordância na metodologia de carcinogênese quimicamente induzida em glândulas salivares animais. Também há incongruência no que se refere aos resultados encontrados pelos autores que estudam esta linha de pesquisa. O presente trabalho tem por objetivo estudar o modelo de carcinogênese química em glândulas submandibulares de ratos. Os achados clínicos dos animais e os aspectos macroscópicos e microscópicos das peças cirúrgicas foram valorizados. Por meio de padronização da metodologia de injeção de DMBA, pretendeu-se avaliar e discutir os padrões histológicos encontrados, na intenção de fornecer dados concretos para estudos vindouros.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Carcinogênese

Um agente carcinogênico é qualquer fator que aumente o risco individual para o desenvolvimento de uma neoplasia (WOOLF<sup>38</sup>, 1998). Segundo Rodrigues & Camargo<sup>24</sup> (1999), os termos carcinogênese ou oncogênese se referem à história natural de uma neoplasia, desde os eventos incipientes de alteração genotípica de uma célula normal até as apresentações fenotípicas tumorais. A carcinogênese pode ocorrer após contato celular com carcinógenos químicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais), físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante) e biológicos (vírus).

Em 1947, Berenblun & Shubik\*, formularam seus conceitos de iniciação e promoção de tumores ao estudarem, experimentalmente, tumores em pele de camundongos. Naquela época sugeriu-se a idéia de interação de um agente carcinogênico como iniciador e uma substância promotora não carcinogênica. Os exemplos utilizados se referiam ao DMBA e óleo de cróton, respectivamente.

Atualmente, aqueles conceitos ainda são válidos. Algumas novas descobertas se somaram aos dados iniciais. Assim, à luz do conhecimento moderno, a carcinogênese completa requer etapas seqüenciais e dinâmicas para o desenvolvimento de tumores.

---

\* BERENBLUM, I; SHUBIK, P. A new qualitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **Br J Cancer**, p.383-91, 1947.

Os conceitos de iniciação, promoção, progressão e manifestação constituem os eventos que marcam as transformações celulares (RODRIGUES & CAMARGO<sup>24</sup>, 1999).

O contato das células com um agente carcinogênico não leva à imediata subversão celular e tecidual. A primeira etapa, conhecida pelo termo iniciação, se traduz pela alteração definitiva do material genético celular (DNA). O carcinógeno pode modificar ou até destruir genes, mas a população celular se mantém inalterada. Um agente promotor carcinogênico ou não, induz a divisão celular no tecido iniciado. O fenômeno de progressão amplia o contingente celular por perda de controle multiplicativo, estabelecendo a manifestação do fenótipo maligno (FRANKS<sup>12</sup>, 1990).

A ativação dos HPA ocorre pelo sistema enzimático do citocromo P-450, do compartimento microssômico hepático, por meio do receptor aril hidrocarboneto. Este receptor é responsável por mediar os efeitos tóxicos, teratogênicos e oncogênicos dos HPA, sendo a primeira etapa do metabolismo destas substâncias (RODRIGUES & CAMARGO<sup>24</sup>, 1999; IDE et al.<sup>19</sup>, 2004).

A ação do sistema P-450 sobre o DMBA, sucintamente, é marcada pela oxidação deste carcinógeno em 3,4-epóxido. Uma hidrólise se segue, formando a substância 3,4-diol. O sistema P-450 novamente é acionado e por oxidação forma o 3,4-diol-1,2-epóxido. As enzimas que participam destes eventos são a CYP1A1 e a CYP1B1, sendo esta última, de intensa expressão em carcinogênese de pele e de glândulas salivares de camundongos. O

3,4-diol-1,2-epóxido tem a capacidade de interagir com o DNA causando mutações (IDE et al.<sup>19</sup>, 2004).

Faz-se mister estabelecer o conceito de mutação. Por meio do fenômeno de tautomerismo, as unidades elementares do DNA, denominadas bases nitrogenadas, podem sofrer permuta interna de radicais ou troca de ligações químicas modificando suas propriedades e forma original. Todavia, este acontecimento não é responsável por alterações na fita de DNA uma vez que, em perfeito funcionamento, a duplicação do material genético se utiliza preferencialmente das bases originais. Se, por acaso, as formas tautoméricas forem utilizadas, a alteração pode ser aceita e até trazer vantagens seletivas entre indivíduos de mesma espécie. Entretanto, alterações de pH ou agentes químicos podem resultar em pareamento incorreto de bases, refletindo em erros na transcrição do DNA ou RNA. Outro dano mutagênico importante é a ação de agentes exógenos, como substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas e irradiação por raios-X. Nas interações entre estes agentes e o DNA há uma reação hidrolítica entre a água e o DNA ou clivagem do esqueleto de DNA, culminando em agressões permanentes às informações genéticas (GRIFFIN<sup>16</sup>, 1990).

Os genes responsáveis pela manifestação de neoplasias são denominados oncogenes. A família de genes *ras* é reconhecida em muitas neoplasias (*H-ras*, *K-ras* e *N-ras*). Conforme Rodrigues & Camargo<sup>24</sup> (1999), o nome *ras* vem de *rat* sarcoma. Os oncogenes, antes de se tornarem ativados são conhecidos como proto-oncogenes. Em carcinogênese química participam tanto os oncogenes como os

genes supressores de tumor p53 e Rb (retinoblastoma) (STANLEY<sup>29</sup>, 1995).

Os mecanismos genéticos em carcinogênese experimental de glândulas salivares não foram completamente elucidados (STANLEY<sup>29</sup>, 1995; BALMAIN & HARRIS<sup>2</sup>, 2000; IDE et al.<sup>18</sup>, 2002). Em se tratando de neoplasias induzidas em pele, mama, pulmão, fígado, bexiga e cólon de camundongos, a família de oncogenes *ras* encontra-se sempre envolvida (STANLEY<sup>29</sup>, 1995; BALMAIN & HARRIS<sup>2</sup>, 2000). As alterações em pele de camundongos após exposição ao DMBA causam mutação no códon 61 alterando o gene *H-ras* (STANLEY<sup>29</sup>, 1995; BALMAIN & HARRIS<sup>2</sup>, 2000; IDE et al.<sup>18</sup>, 2003).

Em neoplasias de camundongos, conforme apontam Balmain & Harris<sup>2</sup> (2000), pode-se esperar recombinações mitóticas e perda de heterozigose e mutação no gene p53, Rb e deleção de p16 homozigoto. O mesmo mecanismo é comparável ao da espécie humana.

O gene p53 desempenha papel crucial no controle do câncer. Mutações neste gene apontam para um prognóstico ruim em pacientes com tumores glandulares (IDE et al.<sup>18</sup>, 2002). Segundo Stanley<sup>29</sup> (1995), o gene p53 tem a capacidade de parar a divisão celular e promover uma verificação do DNA. Em algumas doenças como a síndrome de Li-Fraumeni, há a mutação de um alelo do gene p53. Os pacientes com esta enfermidade podem apresentar tumores mamários, carcinomas adrenocorticais, sarcomas e osteossarcomas, tumores de sistema nervoso e leucemia.

Ide et al.<sup>18</sup> (2002), desenvolveram uma pesquisa com camundongos apresentando certas características particulares. Os animais foram geneticamente alterados para apresentar deficiência em genes p53. Um grupo era constituído de dois alelos sem expressão de gene p53. Outro grupo apresentava somente um gene ativo. Um terceiro grupo, formado de cepas selvagens, apresentava expressão genética de p53 de maneira dominante. Os animais dos três grupos receberam uma injeção intra-glandular de 1mg de DMBA. Os achados desta pesquisa revelaram a presença de neoplasias em 100% dos camundongos que apresentavam total falta de expressão do gene p53. Sob expressão parcial deste gene, 70% dos animais revelaram tumores glandulares. Os animais com genética dominante foram acometidos de neoplasmas somente em 10% dos casos.

Para Balmain & Harris<sup>2</sup> (2000), apesar das diferenças óbvias entre humanos e roedores, com raras exceções, as neoplasias e seu desenvolvimento em diversas regiões mostram interessante similaridade histológica. Estes autores conferem aos camundongos um bom exemplo animal para estudo. A rapidez na formação de tumores nesses animais parece estar associada à ocorrência maior de falhas no reparo do DNA após uso de carcinógenos. Além do mais, células tumorais de camundongos parecem se imortalizar mais facilmente. As células humanas, após alguns ciclos mitóticos, chegam a senescência e morrem. Este evento se processa principalmente por inabilidade da enzima telomerase em manter a integridade cromossômica durante várias divisões.

## 2.2 Carcinogênese química

A carcinogênese química, segundo apreciações retrospectivas de dados epidemiológicos históricos, parece remontar o século XVI. As evidências de envolvimento do meio ambiente e de produtos industriais em carcinogênese foram primeiramente observadas em seres humanos. Dos primeiros indícios destas associações citam-se as descrições de Paracelsus e Agricola que pesquisaram a doença pulmonar em mineiros da região de Schneeberg e Joachimstal, na Europa. Somente trezentos anos após estas observações é que o diagnóstico de neoplasia pulmonar foi sugerido acreditando-se na presença de urânio e seu subproduto, o radônio, nas minas de cobalto e prata daqueles lugares (WEISBURGER<sup>35</sup>, 1994).

Em 1775, Percival Pott, observando o alto índice de câncer de pele de escroto de limpadores de chaminé apontou para a inter-relação entre o contato crônico com o alcatrão e a ocorrência de neoplasias (WIGLEY<sup>36</sup>, 1990)

Rodrigues & Camargo<sup>24</sup> (1999) asseveram que entre 70% a 80% dos tumores humanos se relacionam com fatores ambientais, reforçando os apontamentos de Wigley<sup>36</sup> (1990) e Weisburger<sup>35</sup> (1994).

Uma vez que a espécie humana, no mundo moderno, entra em contato inevitável com uma infinidade de substâncias químicas, testes com produtos químicos se fazem necessários. A indução de tumores pelo uso de substâncias oncogênicas é considerada uma ferramenta experimental essencial para o estudo da

carcinogênese e, também, para testes de drogas e processos industriais direcionados à alimentação (FRANKS<sup>12</sup>, 1990; FASSONI et al.<sup>11</sup>, 1993).

Os estudos controlados com cobaias, utilizando carcinógenos, têm como grupo de maior uso os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O DMBA, entre outros, pertence a este grupo. Segundo os apontamentos de Odukoya & Shklar<sup>22</sup> (1984), o uso de carcinogênese química deve, necessariamente, utilizar duas substâncias. Uma delas deve ser carcinogênica e, portanto, iniciadora e a outra, promotora. Estes autores não consideram o uso do carcinógeno DMBA como substância capaz de responder pelas etapas de iniciação e promoção. Entretanto, Fassoni et al.<sup>11</sup> (1993) asseveram ser o DMBA um carcinógeno completo, respondendo pelas etapas de iniciação, promoção e progressão, em oncogênese de mucosa bucal de hamsters.

### **2.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**

A revolução industrial proporcionou significativas mudanças no modo de vida das pessoas daquela época. Todavia, muitas atividades profissionais trouxeram riscos ocupacionais por contato com substâncias químicas de potencial oncogênico. O uso do alcatrão e de óleos lubrificantes levou ao reconhecimento de carcinógenos denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WOOLF<sup>38</sup>, 1998).

Conforme Woolf<sup>38</sup> (1998), somente em 1915 se relacionou o alcatrão ao tumor de pele em pesquisa experimental. Todavia Skhlar<sup>27</sup> (1970) afirmou ter ocorrido em 1918, por meio das experiências de Yamagiwa e Ichikawa, a indução de tumores de pele com uso de alcatrão.

Woolf<sup>38</sup> (1998) comenta que após estas pesquisas descobriu-se o 1,2 – benzantraceno por meio da destilação incompleta do alcatrão. Esta substância provou ser um carcinógeno fraco. Somente após 1930, Sir Ernest Kennaway e colaboradores isolaram o 3,4 – benzopireno, potente carcinógeno. Este composto está presente no cigarro e na fumaça exaurida de motores a gasolina. Pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos o 7,12 – dimetilbenzantraceno, o 3,4–benzopireno, o 1,2,5,6 – dibenzantraceno e o 3 – metilcolantreno. Fassoni et al.<sup>11</sup> (1993) somam a este grupo o 4-quinolina 1-óxido (4NQO).

Conforme cita El-Mofty<sup>8</sup> (1977), Shafer, em 1962, utilizou vários carcinógenos policíclicos aromáticos, sob forma de implantes, em glândulas salivares de ratos. Suas conclusões o levaram a considerar o DMBA como o mais potente carcinógeno utilizado.

Sumitomo et al.<sup>30</sup> (1996) consideraram o DMBA como o mais potente carcinógeno, atuando tanto como iniciador quanto como promotor.

Para Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000), tratando-se de tumorigênese induzida de glândulas salivares, o DMBA é o melhor agente carcinógeno. Isto ocorre, pois ele é um potente indutor de lesões em curto espaço de tempo.

O DMBA é considerado por IDE et al.<sup>19</sup> (2004) o carcinógeno mais bem estudado e utilizado em carcinogênese experimental.

#### **2.4 Modelos animais para carcinogênese química em glândulas salivares**

O modelo experimental de tumor em pele de camundongos é tido como paradigma de carcinogênese, servindo ao estudo de promoção e progressão neoplásica. Outros animais, ou suas cepas, são necessários quando a intenção é o estudo de oncogênese em órgãos específicos. O camundongo cepa A se apresenta como principal modelo para neoplasias pulmonares por meio do uso dos HPA. Os ratos figuram como outro exemplo para a realização de carcinogênese em rins, bexiga, pâncreas, estômago, intestino (ENZMANN et al.<sup>10</sup>, 1998).

Experimentalmente, o desenvolvimento de câncer bucal e maxilofacial se presta ao estudo dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento de tumores em humanos. Existem metodologias direcionadas aos tumores de lábio, língua, cavidade bucal e nasal. Os animais mais utilizados são os hamsters Sírios dourados. As lesões tumorais em glândulas salivares requerem o uso de ratos (ENZMANN et al.<sup>10</sup>, 1998).

Os ratos foram objeto de estudo de Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), na intenção de padronização de uma metodologia de implante de DMBA na forma de *pellets*.

Chaudhry et al.<sup>5</sup> (1966) escrutaram as diferenças entre carcinogênese química em glândulas salivares de hamsters e de ratos. Seu experimento contou com uso de DMBA associado a propilenoglicol na forma de *pellets* de 1mm<sup>3</sup>. A concentração de DMBA utilizada para todos os animais foi de 0,2; 0,4 e 0,8mg, ou seja, 5%, 10% e 20%. Os autores concluíram que hamsters somente desenvolvem sarcomas. Os ratos apresentaram mais carcinomas em relação a ocasionais sarcomas, perfazendo a proporção de 2,5:1. Quanto maior a concentração de carcinógeno, maior a incidência de neoplasias, sendo carcinomas em ratos e sarcomas em hamsters. Outra conclusão importante estava relacionada a falta de dados no que concerne ao mesmo experimento por meio de injeção direta de DMBA nas glândulas.

Em 1969, Schmutz & Chaudhry<sup>25</sup> desenvolveram estudo no qual injetaram DMBA em solução vaselinada, em glândulas submandibulares de ratos. Sob concentrações de 1% e volume variando de 0,025ml a 0,05ml, 38% a 45% dos animais pesquisados, em vários grupos, desenvolveram carcinomas. Um animal recebeu 1,5% em 0,05 ml, desenvolvendo fibrossarcoma bem diferenciado. Todavia, o uso de 0,05ml de solução de DMBA a 2% produziu tumores em 100% dos animais. Dois ratos apresentaram carcinomas concomitantes a fibrossarcomas. Metástases não foram observadas.

Pesquisas realizadas por Turbiner & Shklar<sup>34</sup> (1969) utilizando *pellets* puros de DMBA, em três espécies distintas de ratos, não revelaram alterações significativas entre elas. Os autores utilizaram ratos Sprague-Dawley, Long-Evans e Wistar e ao final de

13 semanas de estudos todos os ratos apresentaram somente carcinomas.

Segundo Wigley & Carbonell<sup>37</sup> (1976), pode-se utilizar DMBA sob forma de emulsão. Ao DMBA deve ser adicionada acetona. A emulsão é preparada com KY gel, solúvel em água. Os animais utilizados para esta metodologia são camundongos. Estes podem receber 0,05 ml (2mg) de emulsão, por via per cutânea, até as glândulas salivares.

Conforme verificou El-Mofty<sup>9</sup> (1978), o estudo de carcinogênese experimental em glândulas submandibulares tornou-se uma metodologia sedimentada para a pesquisa de tumores glandulares. A fim de estudar a tumorigênese em outros parênquimas glandulares, este autor preconizou a implantação de *pellets* de DMBA em glândula parótida de ratos Fisher. Os passos cirúrgicos seguiram os apontamentos de Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), a não ser pela incisão cervical que foi desenhada de forma semilunar, ao invés de retilínea mediana. Os ratos receberam implantes de DMBA a 5%. Durante vinte semanas, este pesquisador obteve cada vez menos tumores a partir da décima semana, conforme se processavam os sacrifícios. Suas conclusões sugeriram uma regressão espontânea tumoral possivelmente associada à glândula parótida. Todos os tumores obtidos foram carcinomas de células escamosas.

Takai et al.<sup>31</sup> (1984) conduziram pesquisa com injeção de 0,02mg de DMBA em óleo de oliva, nas glândulas submandibulares de camundongos submetidos a crioterapia e laqueadura de artéria e ducto glandular. Os autores diagnosticaram

carcinomas e sarcomas em combinação ou isoladamente. Também encontraram fibrossarcomas e um caso, até então não relatado na literatura, de adenoma pleomórfico com transformação maligna.

Hindy et al.<sup>17</sup> (1995), desenvolveram um levantamento histórico das metodologias de utilização de DMBA. Conforme suas verificações, os animais passíveis de pesquisas experimentais foram os coelhos, os ratos, os hamsters e os camundongos. A glândula submandibular foi tida como objeto de estudo devido às suas proporções e fácil localização. O DMBA foi associado a algumas substâncias (acetona, vaselina, uma mistura de acetona a 10% em água destilada e geléia KY). As variadas concentrações foram injetadas, com ou sem exposição cirúrgica. Para estes autores as soluções utilizadas podem conter desde 0,05ml/0,1% (0,05mg) até 0,05ml/4,0% (2mg) de DMBA. Contudo, as suas pesquisas foram desenvolvidas com *pellets* de 1g de DMBA implantados em submandibulares de camundongos DDY, após acesso cirúrgico. Seus resultados apontaram para a ocorrência de carcinomas epidermóides e somente dois casos de neoplasias semelhantes ao adenoma pleomórfico.

Sumitomo et al.<sup>30</sup> (1996) afirmaram que as pesquisas com carcinogênese em glândulas salivares animais são capazes de induzir neoplasias em 55 a 80% dos casos. Os tumores mais comuns são carcinomas e fibrossarcomas. Os métodos de indução podem ser realizados por injeção de DMBA em solução oleosa ou por implantação de *pellets* ou esponja contendo DMBA. Segundo estes autores, a desvantagem da injeção de carcinógeno se dá pela

dificuldade em localizar o exato local de colocação da droga no estudo histopatológico. Contudo, a vantagem é a fácil utilização da metodologia. Em relação às células responsivas ao carcinógeno, foi evidenciado a marcação de PCNA em estruturas ductais e císticas neoformadas. Fato que, conforme estes pesquisadores, raramente ocorre em parênquimas glandulares normais.

As pesquisas de Zaman et al.<sup>40</sup> (1996) revelaram um fato interessante. Utilizando ratos e ratas Wistar, foi aplicado, por exposição direta das glândulas submandibulares, 0,05 ml de DMBA a 1% em acetona, duas vezes por semana. Todos os animais desenvolveram neoplasias. Estes autores descreveram a indução de adenocarcinomas em 100% das ratas que receberam injeções de DMBA, estando estas lesões associadas a fibrossarcomas, em 50% dos casos. Os ratos, todavia, desenvolveram fibrossarcomas. Somente um caso de carcinoma foi verificado. Estes autores concluíram que a diferença de gêneros contribui para a ocorrência de respostas diferentes entre animais.

O uso de DMBA dissolvido em acetona, conforme os apontamentos de Tsujimoto et al.<sup>33</sup> (1999), em uma única injeção de 50µl (1mg) de solução de DMBA a 1%, em camundongos ICR, foi suficiente para que os animais apresentassem carcinomas. Suas pesquisas imunoistoquímicas, para descobrir o papel do fator de crescimento epidérmico (EGF), na tumorigênese de carcinomas, contudo, não lograram resultado.

Os apontamentos de Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000), determinaram que uma única aplicação de 1% DMBA, dissolvido em

acetona, em ratos, só é capaz de produzir carcinomas e sarcomas. Contudo, uma segunda injeção, após dois meses da primeira, é suficiente para ocorrerem adenocarcinomas.

Na tentativa de descobrir fatores endógenos que promovam a indução de tumores experimentais, Yura et al.<sup>39</sup> (2001) pesquisaram a carcinogênese por injeção de DMBA em camundongos ICR e marcação imunoistoquímica para fator de crescimento fibroblástico (FGF) e para EGF. Eles concluíram que o EGF não desempenha qualquer papel na carcinogênese em comparação ao FGF que demonstrou marcação nas primeiras fases da história natural dos carcinomas.

## **2.5 Carcinogênese experimental em glândulas salivares animais**

Os estudos primordiais de tumorigênese em glândulas salivares ocorreram em 1910, com Löwenstein. Entretanto, somente após a utilização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos as pesquisas se tornaram efetivas (STANDISH<sup>28</sup>, 1957; CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964; SHKLAR<sup>27</sup>, 1970).

Conforme verificou El-Mofty<sup>8</sup> (1977), Benecks e Schroder produziram neoplasias malignas em ratos, em 1939, com uso de benzopireno. Em 1942, Steiner obteve sucesso em induzir carcinomas epidermóides e adenocarcinomas. Ele fez uso de implantes de carcinógeno químico denominados *pellets*, em glândulas submandibulares de ratos, camundongos, hamsters e coelhos. (STANDISH<sup>28</sup>, 1957; CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964; SHKLAR<sup>27</sup>, 1970).

Estudos realizados por outros autores, após os apontamentos de Steiner, revelaram resultados por vezes muito diferentes. Concluiu-se que variados carcinógenos, aplicados sob metodologias diferentes em animais também diferentes resultavam em achados neoplásicos distintos, devido às inerências dos animais (STANDISH<sup>28</sup>, 1957; CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966; TURBINER & SHKLAR<sup>34</sup>, 1969; SHKLAR<sup>27</sup>, 1970; TAKEUCHI et al.<sup>32</sup>, 1975; ELMOFTY<sup>8</sup>, 1977).

Segundo Standish<sup>28</sup> (1957), Steiner acreditou que a origem das neoplasias glandulares, induzidas quimicamente por ele, ocorrera por metaplasia acinar e ductal. Em 1950, Bauer e Byrne apontaram para uma histogênese ligada às células ductais intercalares e mioepiteliais. Gross, em 1953, afirmou acreditar em uma origem neoplásica a partir de células mioepiteliais sem, contudo, apresentar detalhes histopatológicos de seus experimentos.

Uma vez que Standish<sup>28</sup> (1957) não se mostrava satisfeito com as pesquisas conduzidas até sua época, por falta de referências histogenéticas nos artigos sobre carcinogênese em glândulas, este autor iniciou um estudo focado nas transformações histológicas dos tecidos até o aparecimento de tumores. Assim sendo, ele descreveu detalhadamente as fases de formação de neoplasias após a implantação de *pellets* de metilcolantreno e DMBA associados à parafina. Conforme descreveu este autor, as superfícies ventrais cervicais de ratos foram incisadas para a colocação dos implantes nas glândulas submandibulares unilateralmente. As alterações histológicas iniciais apontaram para uma resposta de células gigantes

multinucleadas ao redor do *pellet*. O DMBA pareceu suscitar uma reação conjuntiva mais marcante, com intensa atividade fibroblástica e abscessos. Alguns animais chegaram a apresentar fibrossarcomas. As alterações parenquimatosas iniciais foram exíguas. Contudo, este autor revelou aspectos de proliferação ductal, seguidos de metaplasia escamosa, formação de cistos epidermóides ceratinizados e carcinoma epidermóide. As conclusões deste trabalho indicaram que as neoplasias se originaram dos ductos estriados e, ainda, que o metilcolantreno é um carcinógeno lento, ao passo que o DMBA se mostrou de ação rápida.

O modelo de carcinogênese química fazendo-se uso de *pellets* de DMBA também foi utilizado por Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964). Estes autores apresentaram dados que complementam as pesquisas de Standish<sup>28</sup> (1957). Para eles a incisão cervical anterior deve ser realizada obtendo-se aproximadamente 3,0 cm. A glândula submandibular após exposição deve receber um implante de 5mg de DMBA em pó.

Conforme verificaram Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), após uma semana, as incisões e leitos cirúrgicos dos ratos que receberam implantes de DMBA em seus estudos apresentaram-se fechados. Pequenas massas foram verificadas interessando as glândulas operadas. Somente após três meses as massas foram identificáveis, aumentando volumetricamente as regiões glandulares. As peças excisionadas revelaram, após hemisseção, glândulas com lesões sólidas e lesões císticas.

A história natural dos tumores induzidos por DMBA em *pellets*, conforme Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964) pode ser verificada por meio de etapas bem demarcadas histologicamente. Estes autores dividiram os eventos da carcinogênese nomeando suas fases. Inicialmente, se apresentou uma fase degenerativa na qual ocorreu necrose por coagulação das células ao redor do *pellet* e intensa reação inflamatória. Também ocorreu apagamento dos elementos acinares e persistência dos ductos. O implante do carcinógeno foi circundado por necrose tecidual reparada *a posteriori* por tecido conjuntivo. Estas manifestações histopatológicas foram esperadas nas primeiras quatro semanas de pesquisa.

A fase seguinte, denominada fase proliferativa por Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), consistiu em proliferação de epitélio ductal, formação de cavidades císticas e achados histológicos de displasias epiteliais, principalmente de ductos estriados. A presença de grande estroma hialinizado conteve elementos carcinomatosos, delineando a imagem negativa do *pellet*. O reconhecimento de metaplasia escamosa das paredes císticas, aposição de camadas de células epiteliais e profusão na produção de ceratina evidenciou a terceira fase, denominada fase metaplásica.

A etapa final, denominada fase neoplásica maligna, revelou a presença de carcinomas epidermóides caracterizados por células grandes e bizarras, hipercromáticas e com perda de polaridade e coesão. Os tumores epiteliais encontrados foram carcinomas epidermóides e adenocarcinomas. Em seus achados somente um caso de sarcoma foi diagnosticado, apresentando-se muito pleomórfico e

invasivo. Contudo, sua história natural não foi elucidada (CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964).

Os estudos de Turbiner & Shklar<sup>34</sup> (1969) e Shklar<sup>27</sup> (1970) confirmaram a ocorrência de certos eventos na carcinogênese induzida por implantes de DMBA. Para estes autores, a tumorigênese por DMBA em glândulas salivares se apresentou como um modelo experimental bem documentado, verificando-se as fases histológicas reportadas por Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964).

Em 1975, Takeuchi et al.<sup>32</sup> desenvolveram um estudo com vários carcinógenos injetados em ductos de glândulas salivares submandibulares de ratos machos da espécie *Donryu*. Eles foram capazes de estudar, com o uso de DMBA, as metaplasias escamosas em glândulas salivares submandibulares de ratos até a ocorrência de carcinomas após três a quatro meses de pesquisa. Após sete a oito meses, os sarcomas se mostraram bem evidentes. Outros carcinógenos como o metilcolantreno e o 4NQO, formaram lesões linfoepiteliais após três meses. Lesões compatíveis com adenoma pleomórfico ocorreram entre o quarto e o quinto mês. Em estágios mais avançados foram observados carcinomas e fibrossarcomas. Exíguas alterações histopatológicas foram verificadas com o uso de substâncias não pertencentes ao grupo dos HPA.

Foi idealizada por Wigley & Carbonell<sup>37</sup> (1976), pesquisa com indução de neoplasias por DMBA, por meio de injeção per cutânea, em glândulas salivares submandibulares de camundongos. Estes autores observaram a ocorrência de carcinomas e fibrossarcomas. Contudo, estes achados foram interpretados como

tumores independentes. Para estes autores as células responsivas ao carcinógeno foram as células ductais.

O achado de autores clássicos, no que tange a carcinogênese de glândulas salivares animais, se revelou muito bem documentado em relação aos eventos histológicos da história natural das neoplasias em ratos, conforme El-Mofty<sup>8</sup> (1977). Entretanto, para ele, o conhecimento das alterações celulares e histoquímicas desde os primórdios das lesões até às manifestações de carcinomas ainda necessitava de pesquisas. Assim sendo, este estudioso iniciou um experimento utilizando DMBA a 5%, na forma de *pellet*, em glândulas submandibulares de ratos Fisher. Os animais foram sacrificados a cada quatro semanas, perfazendo 20 semanas. Seus resultados apontaram para a presença de glicoproteínas neutras e mucopolissacarídeos nas primeiras quatro semanas de pesquisa, sugerindo material de origem intracelular acinar e ductal, liberado após destruição destes. A partir da décima semana, todos os seus animais foram diagnosticados como portadores de carcinomas de células escamosas bem diferenciados. Pelo acompanhamento histoquímico das lesões, as conclusões deste trabalho apontaram para uma metaplasia de células acinares e ductais convergindo para a formação de carcinomas.

Takai et al.<sup>31</sup> (1984), em estudo com camundongos, referendaram que as figuras de sarcomas e carcinomas associadas devem receber a designação de “tumores de colisão”. Também, segundo estes autores, a histogênese de tumores glandulares de roedores deve ser considerada como tendo origem ductal. Seus argumentos são baseados no fato de que células ductais, formando

túbulos contorcidos granulares compreendem mais de cinquenta por cento das glândulas submandibulares.

No ano de 1995, Hindy et al.<sup>17</sup>, intencionados em estudar o modelo de carcinogênese por DMBA em glândulas submandibulares de camundongos, não obtiveram sucesso em produzir sarcomas e adenocarcinomas, conforme sua revisão de literatura. Entretanto, além dos casos de carcinoma, diagnosticaram dois casos de lesões semelhantes a adenoma pleomórfico. Para estes autores, o DMBA parece ser um carcinógeno muito potente, causando grande e drástica alteração nas células, sendo necessária a descoberta de uma substância de efeitos mais brandos.

Sumitomo et al.<sup>30</sup> (1996) aludiram o fato de que as glândulas salivares de ratos e camundongos apresentam uma histomorfologia singular, também apontada por Takai et al.<sup>31</sup> (1984). As estruturas ductais são compostas por unidades secretoras e condutoras denominadas túbulos contorcidos granulares. Estas estruturas não são encontradas nos humanos e parecem ser as células parenquimatosas que respondem aos carcinógenos. Por meio de avaliações histoquímicas e imunoistoquímicas, a história natural de tumores induzidos por DMBA em ratos foi estudada. Assim, a histopatologia dos casos revelou uma fase de necrose e degeneração, seguida por metaplasia epitelial e formação de cistos e pseudo-ductos e, finalmente, a ocorrência de carcinoma de células escamosas. Após imunoistoquímica, estes autores apontaram a porção ductal das glândulas como responsáveis por todas as etapas estudadas histoquimicamente.

Segundo Enzmann et al.<sup>10</sup> (1998), em carcinogênese química por DMBA em glândulas salivares, as displasias ocorrem após oito semanas da introdução do *pellet*. Após dez semanas os primeiros tumores se mostram evidentes. Estes autores sugerem que este modelo experimental não preenche os requisitos da definição de iniciação uma vez que o carcinógeno, segundo eles, é utilizado em doses subcarcinogênicas.

Os experimentos de Tsujimoto et al.<sup>33</sup> (1999), com indução de tumores em glândulas salivares de camundongos apontaram para os seguintes eventos histopatológicos: a) inicialmente ocorreu atrofia do ácinos e dos túbulos contorcidos granulares; infiltração linfocítica e fibrose; b) formação de pseudo-ductos e estruturas císticas com metaplasia e c) associação de carcinomas às estruturas epiteliais.

Em 2002, Ide et al.<sup>18</sup> foram capazes de produzir quatro tipos de lesões em glândulas salivares de camundongos: fibrossarcomas, rabiomiossarcomas, carcinomas de células escamosas e carcinossarcomas. O carcinógeno DMBA, na quantidade de 1g, foi injetado em glândulas submandibulares daqueles animais. Esta pesquisa foi realizada com animais alterados geneticamente para expressar pobremente ou não expressar gene p53.

## **2.6 Respostas do hospedeiro às neoplasias induzidas quimicamente**

O efeito de mudanças sistêmicas pode alterar o decurso da indução de lesões por DMBA. Shklar<sup>27</sup> (1970), afirmou que o uso de cortisona intravenosa em animais sob carcinogênese de glândulas salivares diminuiu o tempo de crescimento das lesões, tornando-as mais exuberantes e invasivas. Ainda segundo este autor, o estresse também pode diminuir o tempo de progressão de neoplasias. Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000), atestam congruentemente no que tange ao menor decurso de neoplasias com uso de cortisona.

O crescimento de tumores, após uso de DMBA em glândulas salivares de ratos, para Ciapparelli et al.<sup>6</sup> (1972), parece estar intimamente relacionado à presença do oligoelemento zinco na alimentação. Estes autores verificaram que ratos sendo privados de zinco apresentaram carcinomas mais rapidamente e maiores do que os animais que ingeriram até 250ppm na água. Estes últimos, em alguns casos, não revelaram presença de neoplasias. Outros foram acometidos de carcinomas acompanhados de grande resposta inflamatória e aumento volumétrico de nódulos linfáticos.

Conforme aludem Tsujimoto et al.<sup>33</sup> (1999), os tumores experimentais têm sua evolução retardada pelo uso de isoproterenol. Entretanto, testosterona acelera o processo de indução de tumores. Os mecanismos de retardo e aceleração não foram inteiramente discutidos.

## 2.7 Neoplasias de glândulas salivares em humanos

O quadro nosológico tumoral humano é formado por muitas neoplasias. Na intenção de situar o assunto discorrido a seguir, somente as lesões malignas, de interesse para a pesquisa em questão, serão referidas. Pretendeu-se esboçar generalidades destes tumores em humanos uma vez que sua ocorrência em carcinogênese experimental é muito esperada.

Conforme atestam Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000), alguns tumores comuns em carcinogênese animal, como carcinomas de células escamosas e sarcomas, são raros em humanos.

### 2.7.1 Carcinoma de células escamosas

Em patologia humana, o carcinoma primário de células escamosas é encontrado em menos de 1% dos tumores de glândulas salivares (DARDICK<sup>7</sup>, 1996; LEWIS & OLSEN<sup>21</sup>, 2005; SHAPIRO & BHATTACHARYYA<sup>26</sup>, 2006). A histopatologia dos carcinomas epidermóides não difere daquela de outras regiões topográficas em cabeça e pescoço. São reconhecidas figuras de ceratinização e pontes intercelulares nas massas epidermóides. Ocasionalmente metaplasia e displasia escamosa podem ser reconhecidas em ductos salivares. A invasão do tumor em direção ao parênquima glandular é acompanhada de resposta fibrosa ou desmoplásica do estroma (DARDICK<sup>7</sup>, 1996; LEWIS & OLSEN<sup>21</sup>, 2005).

Segundo Dardick<sup>7</sup> (1996), o diagnóstico de carcinoma primário de células escamosas pode ser confundido pela presença de carcinoma mucoepidermóide indiferenciado, devendo ser pesquisada evidências de mucina intra-citoplasmática. Deve-se descartar, também, a ocorrência de metástase e invasão de lesões maxilofaciais não glandulares.

### 2.7.2 Sarcomas

A ocorrência de tumores benignos mesenquimais, em glândulas salivares humanas, é mais comum que achados de sarcomas. O acometimento de humanos por sarcomas de glândulas salivares é raro. Somente 0,3% das neoplasias malignas é sarcomatosa. Os pacientes acometidos são pacientes idosos. Qualquer tipo de sarcoma pode ocorrer nos sítios glandulares. Os casos publicados remetem aos padrões de hemangiopericitoma, schwannoma maligno, fibrossarcoma e histiocitoma fibroso maligno. Todos extremamente invasivos, agressivos, recorrentes e metastatizantes (GNEPP<sup>14</sup>, 2005).

Os lipossarcomas são os sarcomas mais comuns em adultos. Todavia, são raros em região de cabeça e pescoço. A ocorrência de lipossarcomas pleomórficos é ainda mais rara quando os sítios estudados são as glândulas salivares. Nestas regiões, os rabdiossarcomas e os histiocitomas fibrosos malignos respondem por 40% dos sarcomas (CHANDAN et al.<sup>4</sup>, 2004).

Em estudo de pacientes pediátricos, Shapiro & Bhattachayya<sup>26</sup> (2006) reconheceram 7,8% de rabdiossarcomas em

seus levantamentos. Para estes autores, estas neoplasias têm pior prognóstico em relação a tumores epiteliais glandulares.

Segundo Kariya et al.<sup>20</sup> (2003), muitos casos outrora diagnosticados como rabdomiossarcomas, miossarcomas, lipossarcomas, fibrossarcomas e sarcomas indiferenciados em glândula salivares devem ser classificados como histiocitomas fibrosos malignos. Ainda, para estes autores, podemos subclassificar os histiocitomas fibrosos malignos em: a) tipo pleomórfico-enovelado; b) tipo mixóide; c) tipo de células gigantes; d) tipo angiomatóide e e) tipo inflamatório.

### 2.7.3 Carcinossarcomas

As primeiras observações de existência de tumores mistos malignos parecem remontar ao ano de 1967, no qual King chamou atenção para a neoplasia carcinossarcoma (ALVAREZ-CAÑAS & RODILLA<sup>1</sup>, 1996).

O carcinossarcoma é uma neoplasia maligna extremamente rara em patologia maxilofacial humana. Para Alvarez-Cañas & Rodilla<sup>1</sup> (1996), os carcinossarcomas perfazem somente 0,16% dos tumores malignos de glândulas salivares.

Gnepp et al.<sup>15</sup> (1991), ao fazerem um levantamento dos casos do Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), encontraram somente oito casos. Gnepp<sup>13</sup> (2005) afirmou existir na literatura somente 50 a 60 casos descritos até 2005.

A história natural deste tumor encontra associação com recorrência de um adenoma pleomórfico ou malignização de adenoma configurando um carcinossarcoma em adenoma pleomórfico (GNEPP<sup>13</sup>, 2005). Entretanto, Alvarez-Cañas & Rodilla<sup>1</sup> (1996) referem ser o carcinossarcoma uma verdadeira neoplasia mista, devendo ser diferenciado do carcinoma em adenoma pleomórfico.

Em sua maioria os carcinossarcomas são bifásicos sendo compostos por variações de elementos carcinomatosos e sarcomatosos (GNEPP et al.<sup>15</sup>, 1991; DARDICK<sup>7</sup>, 1996). O componente sarcomatoso mais comum é o condrossarcoma. Outras diferenciações mesenquimais também reconhecidas são o osteossarcoma, fibrossarcoma, leiomiossarcoma, rabiomiossarcoma e o angiossarcoma (DARDICK<sup>7</sup>, 1996). Os carcinomas podem apresentar diferenciação ductal fraca ou ainda, podem ser indiferenciados. De uma maneira geral os carcinossarcomas são muito invasivos e destrutivos (GNEPP et al.<sup>15</sup>, 1991; GNEPP<sup>13</sup>, 2005).

Segundo Dardick<sup>7</sup> (1996), alguns carcinossarcomas podem ter sua origem associada a tumores de células gigantes. Ocasionalmente, alguns carcinossarcomas podem revelar campos histológicos focais de carcinoma epitelial-mioepitelial.

As figuras de anisocitose e anisocariose são comuns e acompanham os campos histológicos dos carcinossarcomas (DARDICK<sup>7</sup>, 1996).

### **3 PROPOSIÇÃO**

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) implantar uma metodologia experimental de carcinogênese química em glândulas salivares submandibulares de ratos.
- b) induzir a formação de neoplasias primárias de estruturas glandulares.
- c) avaliar, do ponto de vista histológico, os achados de nosso estudo e contrastá-los com as descrições encontradas na literatura.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 28 ratos (*Rattus norvegicus*, var. albinus, Wistar), com três meses de idade e peso aproximado de 300g cada. Os animais foram divididos em quatro grupos com sete indivíduos. Todos os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições ambientais apropriadas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* (Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP).

Os ratos foram tratados de acordo com os princípios éticos para pesquisas com animais, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, segundo protocolo nº 038/2004-PA/CEP de 08 de dezembro de 2004 (Anexo A).

O carcinógeno escolhido foi o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, DMBA (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA). Uma solução foi manipulada contendo 2% de DMBA e acetona como veículo. A solução anestésica utilizada para os animais constou de dois agentes: Rompum® (Bayer S.A, Brasil) associado a Dopalen injetável (Agribrands do Brasil LTDA), na proporção de 1:0,5 ml, por via intra-muscular (IM), na dose de 0,1ml/100g.

Todos os animais, operados no mesmo dia, receberam injeção de solução de DMBA nas glândulas submandibulares

esquerdas. Ao final da quinta, décima, décima quinta e vigésima semanas, sete animais de cada grupo foram sacrificados.

Em todas as etapas cirúrgicas utilizou-se de material de proteção individual devido à alta periculosidade da substância carcinogênica DMBA. Fez-se uso de óculos, gorro, máscara, avental cirúrgico descartável e dois pares de luvas para cada operador, tomando-se o cuidado de colá-las à vestimenta por meio de fita adesiva crepe. Técnicos do biotério, que manipularam os animais durante o experimento, também receberam cuidados de proteção.

#### **4.1 Preparação dos animais**

Os animais, previamente divididos em quatro grupos, foram anestesiados por meio de uma solução anestésica contendo um relaxante muscular - cloridrato de 2 - (2,6 - xilidino) - 5,6 - dihidro-4h - 1,3 - tiazina (Rompum®, Bayer S.A, Brasil) associado a um anestésico geral dissociativo - cloridrato de cetamina (Dopalen injetável, Agribrands do Brasil LTDA) na proporção de 1:0,5 ml, por via intra-muscular, na dose de 0,1ml/100g de peso.

Na intenção de preservar o efeito anestésico e o conforto aos animais optou-se por anestésiar e operar individualmente cada grupo, porém no mesmo dia.

Após anestesia, os ratos foram submetidos à tricotomia da região cervical anterior. A anti-sepsia pré-operatória dos ratos foi conduzida com PVPI (Polivinil Pirrolidona Iodo 1% - Ind. Química

Rioquímica LTDA). Os animais de todos os grupos receberam uma incisão cervical, iniciando-se pela região central a 0,5 cm da mandíbula. O término da diérese atingiu, de forma oblíqua, à distância de 0,5 cm da cintura escapular esquerda. Assim sendo, o corte final somou, em média, 3,0 cm em todos os animais. Expuseram-se, então, as estruturas cervicais superficiais esquerdas. O material utilizado para tal procedimento constou de uma lâmina de bisturi 24, montada em cabo Bard-Parker n° 4 (Figura 1).

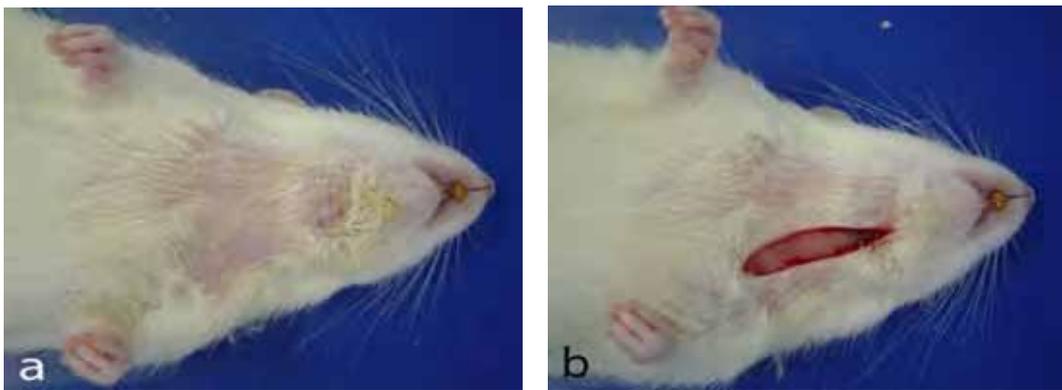


FIGURA 1 - Preparação do animal para a aplicação do DMBA: a) tricotomia; b) incisão cervical,

Após divulsão, as glândulas submandibulares esquerdas foram identificadas. Por meio de uma seringa de 1ml para aplicação de insulina, injetou-se 0,1ml de solução de DMBA a 2% naquelas glândulas. O plano epitelial foi suturado com fio de seda preta 3-Ø em pontos isolados (Figura 2).



FIGURA 2 - Aplicação de solução de DMBA: a) injeção de 0,1ml de DMBA; b) sutura com fio de seda preta 3-Ø, em pontos isolados.

Ao final da quinta, décima, décima quinta e vigésima semanas os animais foram sacrificados utilizando-se doses letais da solução anestésica/relaxante. Novas incisões cervicais foram realizadas na intenção de remover as glândulas salivares maiores do pescoço. As glândulas submandibulares esquerdas foram identificadas por meio de um ponto simples de sutura com fio de seda preta 3-Ø. As peças cirúrgicas foram acondicionadas em frascos de vidro, de boca larga, contendo quantidade suficiente de solução de formaldeído tamponado a 10%.

#### **4.2 Análise histológica**

Após a fixação das peças cirúrgicas em solução de formol a 10%, o material foi examinado macroscopicamente e, posteriormente, incluído em parafina. Os cortes histológicos foram padronizados para apresentar 5µm de espessura. O processo

histoquímico utilizado foi coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina (H/E).

A leitura das amostras foi realizada em microscopia de luz convencional (Axiophot - Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Todo o material obtido foi analisado de maneira qualitativa, procurando-se observar seus aspectos histomorfológicos mais significantes.

### **4.3 Documentação fotográfica**

Todas as etapas da pesquisa, incluindo os períodos pré-sacrifício dos animais, as peças anatômicas e os cortes histológicos, foram documentados e fotografados com câmera digital CCD Sony DSC-S85 Cybershot, com 4.1 megapixels (Sony Inc., Japan).

A partir desse material, foram selecionadas as fotografias e as fotomicrografias mais representativas para confecção do material ilustrativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Aspectos clínicos

Os animais apresentaram boa recuperação do procedimento cirúrgico no qual se injetou solução de DMBA a 2%, mantendo alimentação e hidratação sem alterações. Exceção se fez em relação aos animais 22 e 23 que necessitaram de antecipação de sacrifício devido à dificuldade de alimentação, respiração e deambulação.

De uma maneira geral, as manifestações clínicas de lesões glandulares se tornaram evidentes após dez semanas de pesquisa. Uma elevação cervical anterior esquerda foi verificada em alguns animais (Figura 3).



FIGURA 3 - Abaulamento em região cervical de animal após dez semanas de aplicação do carcinógeno (\*).

### 5.1.1 Quinta semana

Sete animais foram sacrificados constituindo-se o primeiro grupo do estudo. Não foram observadas alterações físicas aparentes nos animais.

Animais 2 e 3: notou-se a presença de supuração proveniente das glândulas submandibulares esquerdas durante o procedimento de excisão das glândulas salivares e estruturas cervicais.

Os outros animais não apresentaram alterações clínicas relevantes.

### 5.1.2 Décima semana

Animais 9 e 13: estes animais apresentaram discreto aumento da região topográfica referente às glândulas salivares submandibulares esquerdas.

Animal 14: notou-se presença de supuração e de aderências entre a glândula e os planos epiteliais cervicais durante a exérese da glândula submandibular esquerda.

Os outros animais não apresentaram alterações clínicas relevantes.

### 5.1.3 Décima quinta semana

Animal 15: aumento clinicamente notável na região cervical anterior. Após incisão do pêlo observou-se presença de secreção purulenta. Uma ulceração, em região central da glândula submandibular esquerda, revelou presença de massa amorfa e esbranquiçada sugestiva de material necrótico. A glândula se apresentou aderida às estruturas adjacentes.

Animal 16: a glândula submandibular esquerda se mostrou aderida à musculatura cervical.

Animal 17: a glândula submandibular se mostrou clinicamente volumosa, apresentando aderências musculares e em profundidade, acometendo região anterior às vias aéreas.

Animal 18: notou-se diminuição volumétrica da glândula submandibular esquerda estando esta aderida às estruturas vizinhas.

Animal 19: observou-se aderência da glândula submandibular esquerda à musculatura mastigatória ipsilateral. Notou-se, na superfície inferior da glândula submandibular, um nódulo acastanhado.

Animal 20: os achados clínicos evidenciaram uma aderência acometendo a glândula submandibular esquerda, cintura escapular e pele ipsilateral.

Animal 21: notaram-se aderências em músculos mastigatórios, cintura escapular e vias aero-digestivas à esquerda.

#### 5.1.4 Décima oitava semana

Animal 22: o animal mostrou-se com exagerado aumento cervical anterior em surto de crescimento (Figura 4). Notou-se dificuldade de deambulação e alimentação da cobaia. Este animal, pertencente ao quarto e último grupo da pesquisa, foi sacrificado duas semanas antes do tempo previsto. A peça cirúrgica foi excisada por meio de plano de clivagem entre as estruturas peri-lesionais. Não se evidenciou separação entre as glândulas salivares. O espécime cirúrgico foi seccionado e revelou consistência flácida e superfícies brancacentas.



FIGURA 4 - Crescimento exagerado de neoplasia. Nota-se a integridade do pêlo.

### 5.1.5 Décima nona semana

Animal 23: notou-se dificuldade de deambulação e respiração deste animal, antecipando-se o sacrifício em uma semana. Após incisão notou-se atrofia glandular à esquerda e aumento volumétrico à direita. As glândulas submandibulares encontravam-se aderidas às cinturas escapulares bilateralmente e comprimindo a traquéia posteriormente.

### 5.1.6 Vigésima semana

Animal 24: lesão de grande volume, abaulando a região cervical anterior esquerda. Após incisão notou-se lesão telangiectásica insinuando-se, com aderências, à região torácica.

Animal 25: a glândula submandibular esquerda mostrou evidente atrofia após abordagem cirúrgica.

Animal 26: notou-se atrofia de glândula submandibular esquerda com aderências às estruturas peri-glandulares.

Animal 27: evidente aumento volumétrico cervical esquerdo. Após incisão, notou-se lesão multilobulada, em região de glândula submandibular esquerda. A região cervical direita não revelou alterações. A excisão glandular requereu remoção do músculo masseter esquerdo.

Animal 28: sem evidências de alterações clínicas. Após incisão foram notados sinais sugestivos de atrofia da glândula submandibular esquerda. Este órgão se apresentou com aspecto macroscópico semelhante a gordura. Aderências ao músculo masseter ipsilateral foram observadas.

## **5.2 Macroscopia das peças cirúrgicas**

Todas as glândulas salivares e estruturas removidas apenas a elas foram acondicionadas em vidros de boca larga e com quantidade suficiente de solução tamponada de formol a 10%.

Após fixação das peças cirúrgicas procedeu-se a macroscopia do material obtido. Notou-se no primeiro e segundo grupos, respectivamente, facilidade e moderada facilidade de identificar estruturas anatômicas. Também se mostrou evidente uma manutenção das dimensões volumétricas glandulares, assemelhando, o material, às glândulas normais. Após hemissecação pôde-se apontar, mesmo em presença de lesões, os limites estruturais das glândulas submandibulares esquerdas e direitas (Figura 5).



FIGURA 5 - Peças cirúrgicas de animal pertencente ao primeiro grupo. Pode-se identificar as glândulas submandibulares direita (\*) e esquerda (+).

Todavia as peças cirúrgicas do terceiro e quarto grupos revelaram outras características. Observou-se dificuldade em reconhecer os parênquimas glandulares e seus limites após hemissecção. Tornou-se patente o apagamento de estruturas e sua substituição por tecido sólido ou por estruturas císticas ou por combinação de ambos (Figura 6).

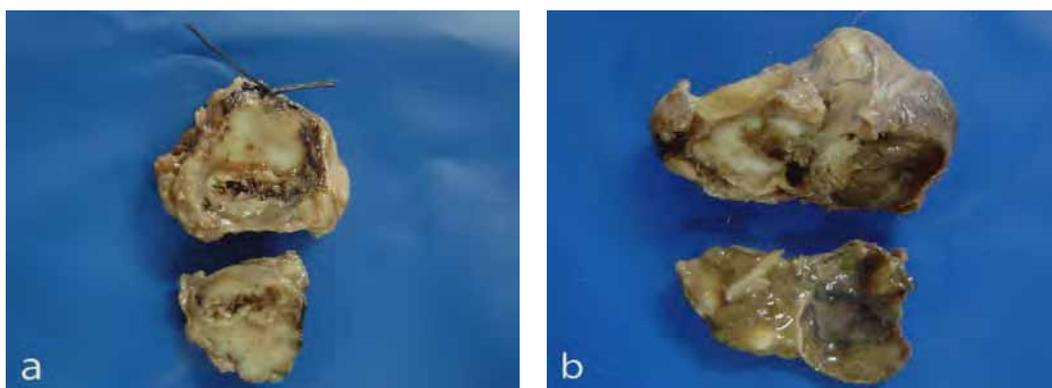


FIGURA 6 - Peças cirúrgicas evidenciando alterações macroscópicas: a) a glândula submandibular esquerda apresenta predominância de tecido sólido envolvendo estrutura cística; b) evidências de aumento volumétrico glandular com a presença de grande estrutura cística que verteu líquido marrom-acastanhado no momento de sua clivagem.

### **5.3 Aspectos histopatológicos**

Todos os diagnósticos histopatológicos foram realizados baseando-se na coloração por Hematoxilina e Eosina. Os resultados histopatológicos da pesquisa se encontram agrupados na seção anexos. A seguir, as descrições histológicas dos casos.

#### **5.3.1 Quinta semana**

Animal 1: notou-se extensa destruição parenquimatosa glandular e apagamento da identidade secretora. Um ducto excretor dilatado, roto, com hiperplasia epitelial e células com discreto pleomorfismo foi evidenciado. Uma estrutura prolongando-se em forma de gota apontou uma incipiente invasão mural (Figura 7). A cápsula de tecido conjuntivo fibroso e algumas áreas do estroma apresentaram fibroblastos com aspecto menos fusiforme e mais arredondado. Outras áreas revelaram grande quantidade de inflamação purulenta e neutrófilos.

Animal 2: os cortes histológicos revelaram parênquima de glândula submandibular normal e regiões com perda das unidades acinares, dilatação das estruturas ductais e vasos sanguíneos dilatados e ectásicos (Figura 8). Algumas células ductais mostraram-se com aspecto de degeneração hidrópica. Na luz dos vasos, coleções de polimorfonucleares foram observadas. O estroma conjuntivo revelou

células fibroblásticas com polimorfismo leve e neutrófilos em profusão. Nódulos linfáticos hipertróficos completaram o quadro histológico.

Animal 3: observou-se normalidade do parênquima glandular submandibular. Entretanto, uma região de interface entre a glândula submandibular e a glândula parótida revelou dilatação ductal associada a êmbolos de neutrófilos. Também se notou imagens artefatuais de perda de coesão parenquimatosa da glândula submandibular. O estroma conjuntivo apresentou celularidade discretamente polimórfica. Completando o quadro visualizou-se nódulo linfático hipertrófico.

Animal 4: evidenciou-se interface entre glândula submandibular e glândula parótida com apagamento do parênquima submandibular (Figura 9). Nesta região houve proliferação de epitélio ductal em continuidade a esta glândula. Células inflamatórias polimorfonucleares e epiteliais foram encontradas nas luzes ductais. Algumas projeções ductais murais se insinuaram no conjuntivo (Figura 10). Os vasos sanguíneos se mostraram ectásicos e dilatados. Alguns focos hemorrágicos intra-glandulares submandibulares foram visualizados. Nódulos linfáticos contínuos à glândula submandibular foram verificados.

Animal 5: notou-se preservação da histomorfologia glandular. Todavia, algumas regiões revelaram perda arquitetural dos ácinos mucosos. Na intimidade do parênquima glandular submandibular pôde-se reconhecer uma região extensa de necrose tecidual. Em outra região verificou-se a presença de proliferação de

estruturas nervosas sem, todavia, apresentar atipias. Na intimidade da cápsula foram encontrados vasos dilatados e ectásicos. Alguns poucos fibroblastos apresentaram-se mais achatados, sem seu aspecto fusiforme. Completando o quadro observou-se a ocorrência de nódulos linfáticos hipertróficos.

Animal 6: observou-se manutenção dos parênquimas glandulares. Na interface entre glândulas submandibular e parótida evidenciou-se extensa hemorragia. A glândula submandibular apresentou regiões marcadas por proliferação de massas epiteliais diferenciando-se em estruturas ductais. O interior dos ductos mostrou-se preenchido por êmbolos de neutrófilos e células epiteliais. Algumas células ductais se revelaram com núcleos aumentados e hipercromáticos. Outros campos revelaram proliferação de estruturas nervosas adjacentes aos ductos dilatados. Em associação às glândulas foram verificados nódulos linfáticos hipertróficos.

Animal 7: os parênquimas glandulares mantiveram morfologia arquitetural normal. As glândulas submandibulares apresentaram regiões de dilatação ductal sem a ocorrência de hiperplasia de parede. Observou-se a continuidade de fibras musculares em relação ao órgão submandibular. A cápsula fibrosa desta glândula revelou a presença de fibroblastos discretamente polimórficos. Extensas áreas de necrose apagaram a arquitetura periglandular. Alguns campos revelaram perda de tecido acometendo fibras musculares estriadas. Os linfonodos se apresentaram hipertróficos.

### 5.3.2 Décima semana

Animal 8: o material examinado constou de lesões císticas ductais apresentando pleomorfismo celular e luzes preenchidas por neutrófilos e figuras de ceratina. O parênquima da glândula submandibular evidenciou uma região de perda de arquitetura glandular com ácinos mucosos aumentados em tamanho. Houve a ocorrência de padrões de necrose tecidual acometendo glândula submandibular, glândula parótida e linfonodo, com apagamento dos limites desta última estrutura. Outras regiões revelaram focos de hemorragia na intimidade da glândula submandibular. Contudo, o restante das estruturas não apontou anormalidades.

Animal 9: observou-se apagamento de parte do parênquima da glândula submandibular, sendo substituído por áreas de necrose tecidual, encerrando ductos ora pequenos ora dilatados, em forma de cistos. As células ductais se revelaram pleomórficas. Notou-se, também, presença de massas epiteliais com ceratinização individual e polimorfonucleares, em estroma aparentando desmoplasia (Figura 11). A cápsula fibrosa, por vezes, revelou a presença de ductos associados a proliferação de nervos. Os nódulos linfáticos se mostraram hipertróficos. Em alguns campos, notou-se a permeação de células fibroblásticas aumentadas de tamanho, em estroma linfático.

Animal 10: as unidades acinares submandibulares se apresentaram com marcada alteração histomorfológica, revelando

contornos pouco nítidos, principalmente envolvendo as células mucosas. Uma região próxima da interface entre as glândulas submandibulares e parótida apresentou proliferação e dilatação ductal e ectasia vascular. Os ductos foram mal formados e encerraram, em seu interior, um material amorfo. Em outras regiões notou-se união da cápsula ao parênquima glandular. Na intimidade deste tecido conjuntivo observaram-se células inflamatórias polimorfonucleares e massas epiteliais se diferenciando em ductos (Figura 12). Ao redor destas estruturas se apresentaram fibroblastos com pleomorfismo celular. Ainda nestes campos pôde-se verificar a ocorrência de vasos sanguíneos de variados calibres, com ou sem parede muscular, ectásicos e dilatados e imagens de necrose tecidual. Também se verificaram nervos em proliferação na intimidade dos vasos sanguíneos. Os nódulos linfáticos se apresentaram hipertróficos. Os planos profundos musculares por vezes encontraram-se associados ao tecido conjuntivo da cápsula sem, contudo, haver invasão.

Animal 11: os cortes histológicos revelaram parênquima de glândula submandibular, ora com arquitetura normal, ora com apagamento das estruturas secretoras e ductais por invasão conjuntiva. Áreas de necrose tecidual foram permeadas por massas celulares coesas e ductiformes e muitas células polimorfonucleares. Estas células inflamatórias também foram verificadas no interior luminal das estruturas ductais e pseudo-ductais. O forramento destas estruturas se apresentou variando de simples a estratificado com presença de células polimórficas. Notou-se, também, proliferação de tecido conjuntivo fibroso orientando-se em direção aos planos

musculares profundos, porém, sem invasão. O parênquima glandular parotídico também se apresentou subvertido e circundado pelo tecido conjuntivo sendo, ocasionalmente, permeado por este. Os nódulos linfáticos encontram-se hipertróficos.

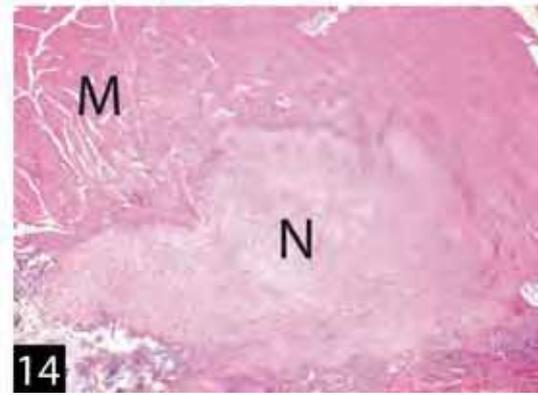
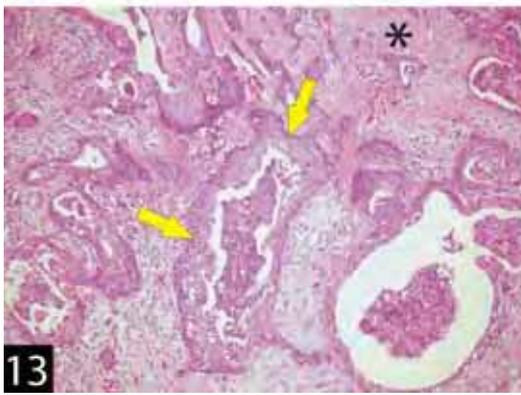
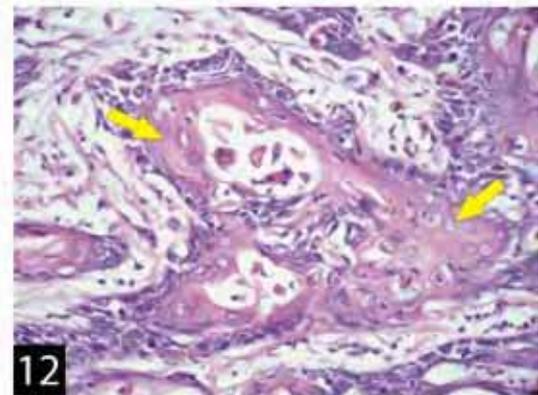
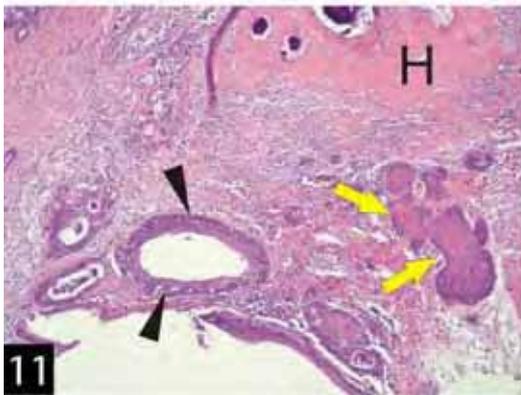
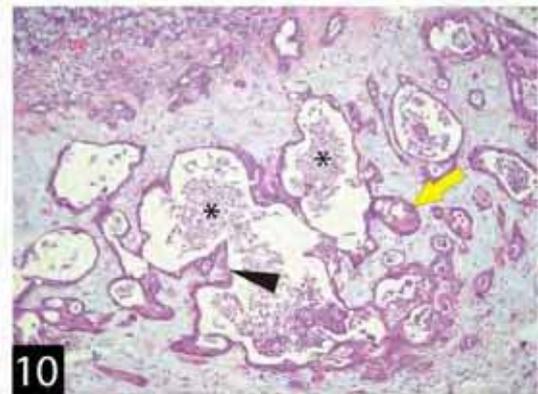
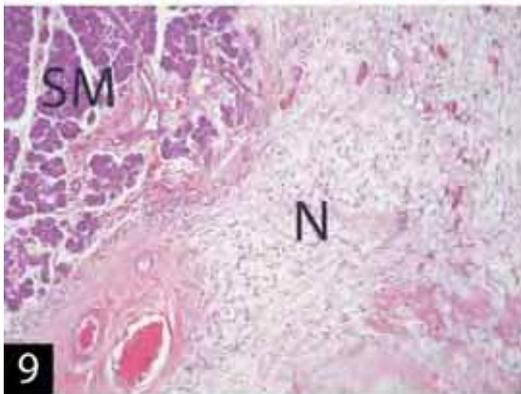
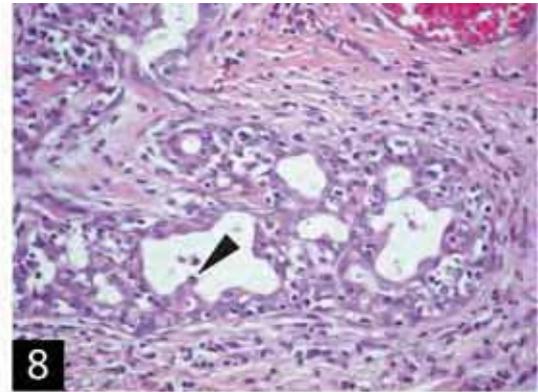
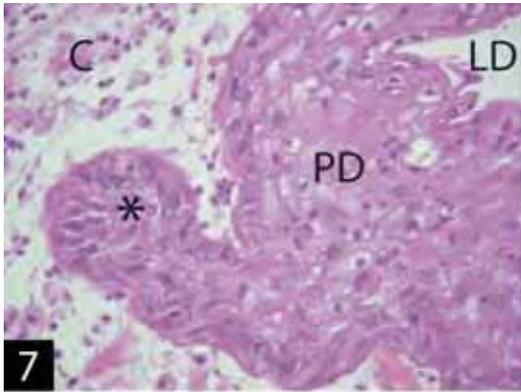
Animal 12: notaram-se remanescentes de glândula salivares submandibulares separados por tecido conjuntivo, com variados graus de celularidade, figuras de necrose tecidual e pseudo-abscessos. Alguns fibroblastos revelaram discreto pleomorfismo. Verificou-se no estroma, ainda, a proliferação de estruturas ductais e pseudo-ductais alojando, em sua luz, células inflamatórias polimorfonucleares. As células de revestimento dos ductos e pseudo-ductos revelaram-se com contornos pouco nítidos. Os planos musculares profundos fizeram interface com o tecido conjuntivo lesional. Nódulos linfáticos hipertróficos e outros parênquimas glandulares sem anormalidades completaram o quadro histológico.

Animal 13: evidenciaram-se várias figuras de ductos salivares hiperplásicos, revelando atipias celulares ocasionais (Figura 13). Alguns ductos apresentaram proliferação celular moderadamente polimórfica em projeção. Outros ninhos celulares epidermóides se insinuaram no estroma conjuntivo, por vezes, sugerindo pseudo-ductos. As luzes das estruturas ductais e pseudo-ductais encerraram, em seu interior, células polimorfonucleares e algumas células epiteliais ductais. Ao redor destas estruturas percebeu-se extensa necrose e remanescentes de parênquima glandular submandibular. Associou-se a este quadro um linfonodo intimamente justaposto ao

estroma conjuntivo e às figuras de necrose e grande fragmento de glândula submandibular com integridade morfológica.

Animal 14: notou-se, na intimidade dos tecidos musculares, a presença de extensa área de necrose (Figura 14). Figuras de pseudo-abscesso se mostram evidentes e próximas de nódulos linfáticos hipertróficos. Outras áreas revelam parênquimas glandulares sem evidências de alterações celulares ou arquiteturais.

- FIGURA 7 - Nota-se estrutura ductal em detalhe. À direita pode-se reconhecer a luz do ducto (LD) e a parede do ducto (PD). Observar uma projeção em forma de gota (\*) em direção ao conjuntivo (C). H/E 400x.
- FIGURA 8 - Nota-se moderada proliferação de células ductais. A cabeça de seta aponta uma projeção intra-luminal. H/E 400x.
- FIGURA 9 - Extensa área de apagamento de parênquima glandular e necrose tecidual (N) acha-se presente e próxima a remanescente de lóbulo de glândula submandibular (SM). H/E 100x.
- FIGURA 10 - O quadro histológico revela proliferação ductal (cabeça de seta) e massa de células epiteliais ductais se insinuando para o conjuntivo (seta). Nas luzes dos ductos são vistos polimorfonucleares neutrófilos (\*). H/E 100x.
- FIGURA 11 - Nota-se a presença de ducto com hiperplasia de parede (cabeça de seta) e massas epiteliais em proliferação (setas). A área focal de hialinização (H) completa o quadro histopatológico. H/E 100x.
- FIGURA 12 - Ilhota de neoplasia revelando formação de estruturas pseudo-ductais e metaplasia escamosa nas células centrais (setas). H/E 400x.
- FIGURA 13 - As setas revelam a hiperplasia da parede de um ducto neoformado. Na luz deste encontramos restos epiteliais e células inflamatórias. Nota-se uma região focal de hialinização (\*). H/E 100x.
- FIGURA 14 - Pode-se verificar a extensa área de necrose (N) de permeio a fibras musculares estriadas esqueléticas (M). H/E 25x.



### 5.3.3 Décima quinta semana

Animal 15: os cortes histológicos apresentaram lesão cística epitelial com estratificação variável (Figura 15). Figuras de invasão mural foram evidenciadas. As células epiteliais mantinham-se com pleomorfismo moderado. Ceratinização intra-luminal se mostrou patente. Alguns campos do estroma apresentaram aspectos sugestivos de áreas ósteo-condróides. Notou-se, nestas regiões, a presença de células polimórficas e fusiformes com aspecto fibroblástico. O parênquima glandular submandibular se apresentou atrófico. Um nódulo linfático, associado à lesão, foi evidenciado. Diagnosticou-se o caso como carcinossarcoma.

Animal 16: observou-se a presença de dois padrões distintos de parênquima de glândula submandibular. Um deles apresentou aspecto de normalidade. O outro revelou organização celular acinar coesa e com hipercromatismo. Contudo, não se verificou a ocorrência de atipias. Puderam-se observar, também, áreas extensas de tecido conjuntivo frouxamente arranjado e muitos vasos sanguíneos pequenos e ectásicos. Por vezes o tecido conjuntivo envolveu fibras musculares. Compuseram também o quadro nódulos linfáticos hipertróficos. Não se diagnosticou neoplasia neste caso.

Animal 17: uma lesão cística epitelial pôde ser evidenciada. (Figura 16 e 17). Seu revestimento era composto por epitélio pavimentoso estratificado descontínuo, por vezes atrófico e, por vezes, hiperplásico. O estroma conjuntivo encerrou pérolas

córneas e apresentou figuras mesenquimais alongadas, sugerindo parênquima muscular neoplásico. Outros campos revelaram a ocorrência de células gigantes e células fusiformes polimórficas (Figura 18). Um padrão mixóide foi verificado englobando remanescentes de ácinos submandibulares. O diagnóstico foi carcinossarcoma

Animal 18: evidenciou-se a presença de interseção de figuras de carcinoma anaplásico e áreas de desmoplasia. A neoplasia se mostrou circundada por estroma de tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado. Vasos dilatados e ectásicos, bem como figuras de hemorragia, estiveram presentes. Outros achados, como presença de nódulo linfático e parênquimas glandulares histomorfologicamente preservados, compuseram o quadro histológico.

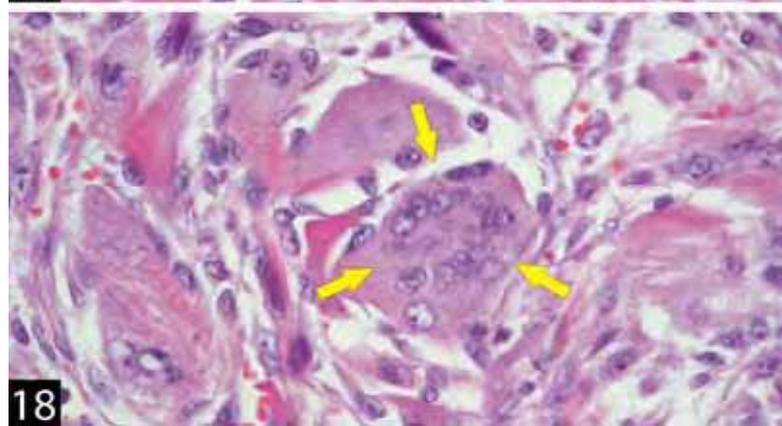
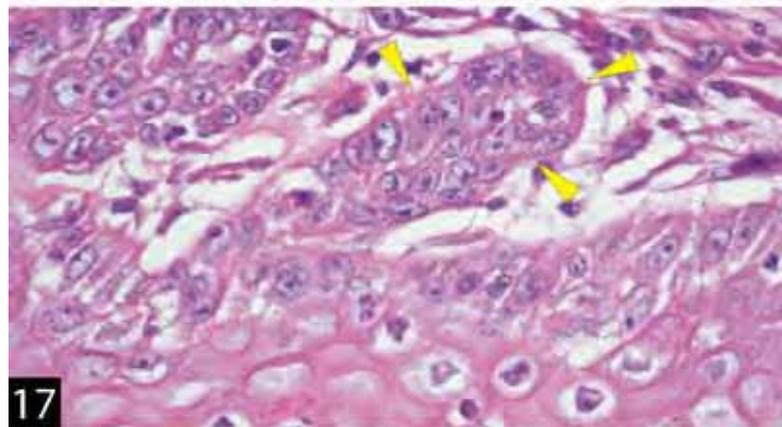
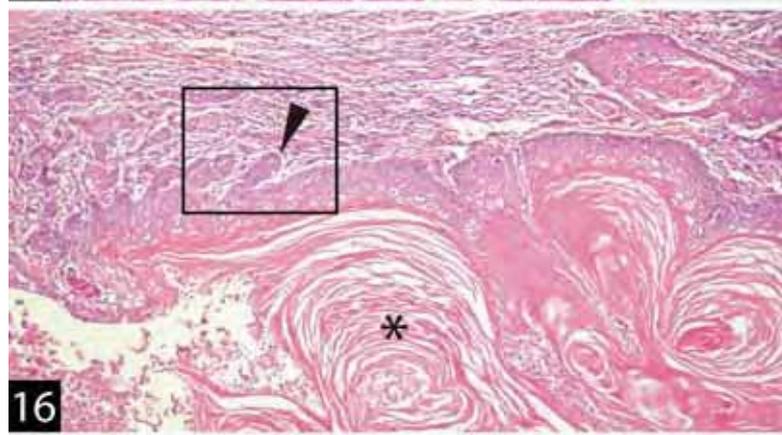
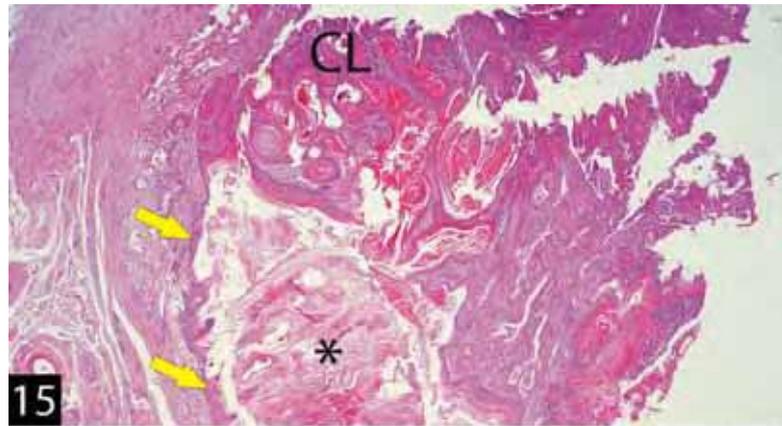
Animal 19: os campos histológicos revelaram lesão cística revestida por epitélio estratificado e hiperplásico, formando ceratina profusamente. Notaram-se figuras de células carcinomatosas invadindo estroma conjuntivo. O tecido conjuntivo se revelou intensamente vascularizado. Pôde-se notar, formando a cápsula tumoral, um conjunto de células polimórficas mesenquimais adjacentes à porção carcinomatosa e aos planos musculares. O caso foi diagnosticado como carcinossarcoma.

Animal 20: os cortes histológicos revelaram uma lesão cística única separada do parênquima glandular submandibular normal. O interior da luz da lesão evidenciou profusão de figuras de ceratinização. O revestimento da lesão mostrou-se marcado por

hiperplasia epitelial papilomatosa. A celularidade polimórfica revelou hipercromasia nuclear e figuras ocasionais de pérolas córneas e ceratinização intra-epitelial. O estroma se mostrou marcado por infiltrado inflamatório predominantemente crônico mononuclear com presença de vasos sanguíneos pequenos e congestos. Figuras de hialinização ocasionais foram encontradas. Diagnosticou-se a neoplasia como carcinoma intra-luminal/intra-mural.

Animal 21: os campos histológicos mostraram a ocorrência de células fibroblásticas anaplásicas em associação a campos de aspecto condróide. Outras áreas revelaram feixes e estruturas luminais delimitadas, parcialmente, por células fusiformes. Imagens de invasão muscular foram visualizadas em alguns campos. Uma figura luminal, revestida por epitélio atrófico e epitélio hiperplásico ductal, se mostrou evidente. Os parênquimas glandulares não mostraram alterações histomorfológicas. Contudo, imagens de neoplasia sarcomatosa foram evidenciadas em continuidade à glândula submandibular. Foram observadas, em objetivas de grande aumento, conjuntos de células epiteliais invadindo o estroma conjuntivo de forma intra-mural. Completando o caso notaram-se imagens sugestivas de adipócitos, entretanto, sem distinção de seus núcleos. Diagnosticou-se a lesão como carcinosarcoma.

- FIGURA 15 - Estrutura cística com parede ductal revestida por epitélio (setas), apresentando formação de carcinoma epidemóide luminal (CL). Notar presença exuberante de ceratina (\*). H/E 25x.
- FIGURA 16 - Formação de carcinoma epidermóide com proliferação mural (cabeça de seta). Presença de grande quantidade de ceratina na porção luminal (\*). H/E 100x.
- FIGURA 17 - Detalhe da figura anterior. Presença de células neoplásicas (cabeças de seta) revelando pleomorfismo celular e nuclear evidentes. H/E 630x.
- FIGURA 18 - Detalhe da presença de célula gigante multinucleada (setas) e células polimórficas em área de invasão de musculatura estriada esquelética. H/E 630x.



#### 5.3.4 Décima oitava semana

Animal 22: notou-se a presença de lesão cística, revelando células carcinomatosas intra-luminais formando um padrão papilar/papilífero. O epitélio neoplásico se mostrou ora atrófico ora hiperplásico. Áreas focais evidenciaram a presença de massas epiteliais e células individuais e pérolas córneas. Um padrão mixóide, por vezes em interface com padrão fasciculado, foi evidenciado (Figura 19). Ambos os padrões mostraram orientações variadas de seus fascículos sendo mais evidente a atipia celular no padrão sólido fasciculado. O estroma revelou vasos congestos e figuras de angiogênese. Também foram evidentes áreas de interface entre músculos e sarcoma. A glândula parótida se mostrou englobada pela neoplasia mesenquimal. Alguns campos histológicos evidenciaram atrofia da glândula submandibular com presença de infiltrado inflamatório mononuclear e ductos. Outras áreas revelaram remanescentes de glândula submandibular envoltos pela neoplasia mesenquimal. Observou-se nódulo linfático hiperplásico. Diagnosticou-se um carcinossarcoma.

### 5.3.5 Décima nona semana

Animal 23: os cortes histológicos revelaram neoplasia mesenquimal. Notou-se padrão sólido celularizado com áreas de células fibroblásticas, polimorfas, em arranjos isolados ou dissociando e invadindo músculos ou associadas a células gigantes. Células atípicas e anaplásicas foram evidenciadas em outros campos histológicos. O diagnóstico definiu um sarcoma.

### 5.3.6 Vigésima semana

Animal 24: os cortes histológicos apresentaram neoplasia predominantemente sólida, mesenquimal, associada a poucas imagens de grupos de células epiteliais. Foram evidenciadas áreas de fasciculação fibroblástica em justaposição a áreas de aparência mixóide. Figuras de dilatação e congestão vascular foram notadas bem como áreas de hemorragia extensa. Outros campos, em objetivas de grande aumento, revelaram células mesenquimais anaplásicas e mitoses atípicas. Ninhos de células epiteliais, moderadamente diferenciadas e com núcleos hipercromáticos, foram observados em associação ao padrão mixóide. As ilhas epiteliais se mostraram ora individualmente ceratinizadas, ora formando pérolas de

ceratina. Não foram evidenciados parênquimas glandulares. O diagnóstico definiu um carcinossarcoma (Figura 20).

Animal 25: o caso 25 não apresentou qualquer alteração histopatológica glandular. Notou-se presença de hiperplasia de nódulos linfáticos.

Animal 26: notou-se lesão cística revestida por epitélio escamoso revelando proliferação intra-luminal e presença de acentuada ceratinização. Houve ocorrência de células com perda da relação núcleo/citoplasma e pleomorfismo celular e nuclear. Observou-se, também, a presença de pérolas córneas na intimidade da lesão intra-luminal. O tecido conjuntivo evidenciou células fibroblásticas com grande pleomorfismo, envolvendo massas epiteliais e, por vezes, imagens de hialinização (Figura 21). O infiltrado inflamatório presente se mostrou mononuclear. Os parênquimas glandulares foram evidenciados sem ocorrência de alterações arquiteturais. A lesão tumoral mostrou-se acolada à glândula submandibular e contínua à glândula parótida. Outros campos histológicos mostraram células epiteliais e nervosas atípicas associadas à glândula parótida. Diagnosticou-se o caso como carcinossarcoma.

Animal 27: observou-se estrutura cística revestida por epitélio escamoso estratificado projetando-se para a luz e, por vezes, revelando projeções papilíferas. Uma profusa produção de ceratina foi verificada. A espessura epitelial foi variável, desde poucas camadas a imagens de hiperplasia. Outros campos histológicos mostraram invasão mural de células epidermóides isoladas ou agrupadas. As

massas epiteliais, ocasionalmente, apresentaram pérolas córneas, mitoses atípicas, anisocitose, anisocariose e subversão da relação núcleo/citoplasma (Figura 22). Ilhas de células neoplásicas foram evidenciadas, ocasionalmente, se insinuando ao redor de estruturas vasculares. A cápsula fibrosa revelou infiltrado inflamatório polimorfonuclear e vasos congestos e dilatados. Traços de parênquima glandular submandibular, externamente à cápsula, foram observados. O diagnóstico foi de carcinoma intra-mural/intra-luminal.

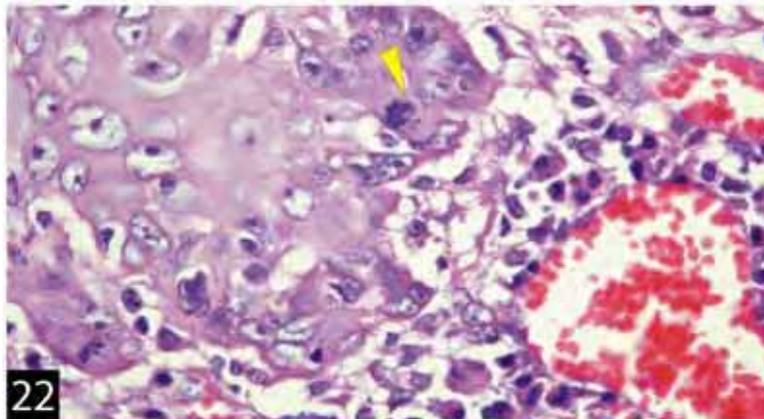
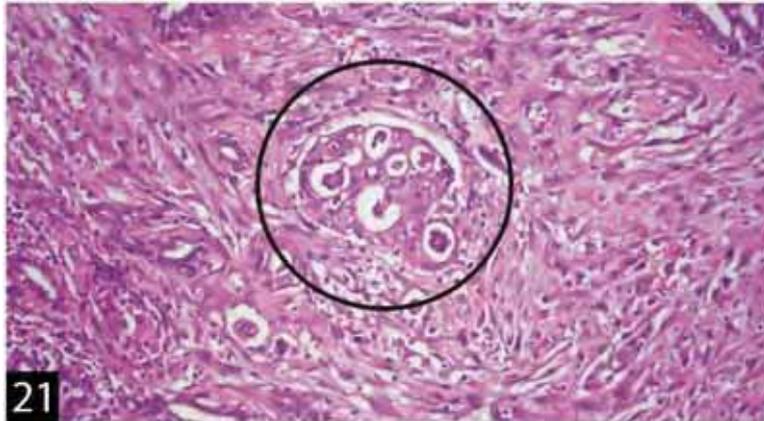
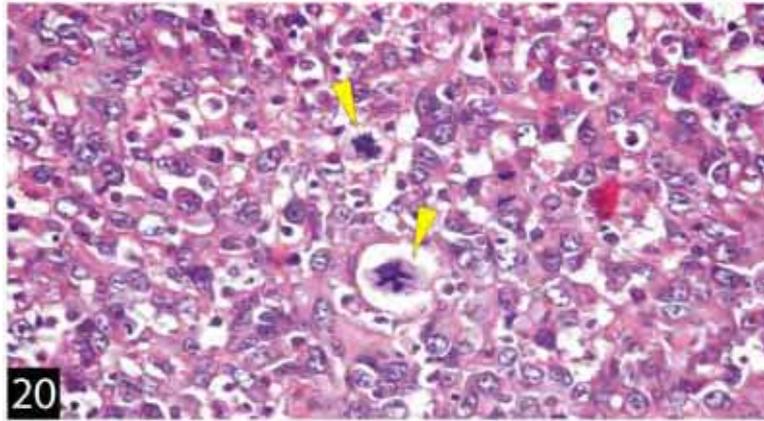
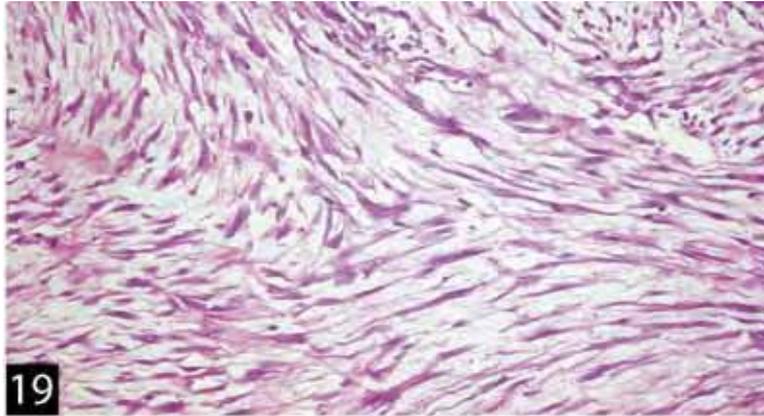
Animal 28: os parênquimas glandulares se mostraram com arquitetura preservada. Todavia, observaram-se campos com uma perda volumétrica de parênquima submandibular associado a hiperplasia de nódulo linfático. Na intimidade da glândula parótida, verificou-se presença de áreas com ductos apresentando células levemente pleomórficas, circundadas por tecido conjuntivo denso. Os tecidos musculares encontraram-se contínuos às áreas de fibrose e espessamento vascular sem, contudo, evidenciar neoplasia ou infiltração.

FIGURA 19 - Padrão neoplásico fasciculado e mixóide, exibindo células fusiformes alongadas, representando área sarcomatosa de um carcinossarcoma. H/E 200x.

FIGURA 20 - Intenso pleomorfismo celular e nuclear, com presença de figuras de mitoses atípicas (cabeça de seta). H/E 400x.

FIGURA 21 - Carcinossarcoma. O círculo aponta para uma ilhota de células epiteliais malignas, de permeio a porção sarcomatosa. H/E 200x.

FIGURA 22 - Massa neoplásica epitelial próxima a espaço vascular ectásico e congesto. Notar figura de mitose atípica (cabeça de seta). H/E 630x.



## 6 DISCUSSÃO

O reconhecimento de que os seres humanos são susceptíveis a agentes carcinogênicos remonta ao século XVI (WEISBURGER<sup>35</sup>, 1994). Segundo Rodrigues & Camargo<sup>24</sup> (1999), no século XVIII, Percival Pott sugeriu a participação do alcatrão em tumores de pele. A confirmação destas suspeitas veio com os experimentos de Yamagiwa e Ichikawa em 1915, conforme Woolf<sup>38</sup> (1998) ou em 1918, segundo Skhlar<sup>27</sup> (1970). A descoberta dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos se deu nesta aludida época pela destilação do 3,4-benzopireno (WOOLF<sup>38</sup>, 1998).

O conhecimento e entendimento acerca da história natural de carcinomas foram obtidos após experimentos em pele de camundongos. Formulou-se, em 1947, a idéia de agente carcinógeno e agente promotor, segundo Odukoya e Skhlar<sup>22</sup> (1984). Modernamente, conforme Rodrigues & Camargo<sup>24</sup> (1999), a carcinogênese é representada pelas seguintes fases: iniciação, promoção e progressão, com conseqüente manifestação tumoral.

Odukoya & Shklar<sup>22</sup> (1984) não acreditaram que o DMBA respondesse sozinho pelas etapas da carcinogênese. Entretanto, conforme os apontamentos de Shafer (1962)<sup>\*</sup>, e os achados de Sumitomo et al.<sup>30</sup> (1996), Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000) e Ide et al.<sup>19</sup> (2004), a substância DMBA é o carcinógeno policíclico aromático de

---

<sup>\*</sup> SHAFER, W.G. Experimental salivary gland tumorigenesis. **J Dent Res**, v.41, p.117, 1962.

escolha para a pesquisa com roedores, sendo potente indutor e promotor de neoplasias. Fassoni et al.<sup>11</sup> (1993) classificaram o DMBA como carcinógeno completo. Em nosso experimento, tornou-se evidente que, uma única injeção intra-glandular de DMBA a 2%, foi totalmente responsável pela indução de neoplasias. Ficou claro que o DMBA se apresenta como um carcinógeno completo. Discute-se, então, qual o real significado da idéia de Enzmann et al.<sup>10</sup> (1998) que afirmam ser o DMBA subcarcinogênico nos experimentos de tumorigênese de glândulas salivares. Uma vez que o contato celular com o agente oncogênico desencadeia uma série de eventos oxidativos e de detoxificação, culminando em agressão ao DNA e expressão de fenótipo maligno, não se pode negar o papel carcinogênico do DMBA.

Geneticamente, os tumores animais e humanos parecem guardar semelhanças, compartilhando um desenvolvimento coincidente (BALMAIN & HARRIS<sup>2</sup>). O conhecimento acerca do papel de genes, como os da família *ras* e o p53, parece bem conhecido em carcinogênese experimental e humana. Contudo, os eventos genéticos em carcinogênese experimental de glândulas salivares não estão completamente esclarecidos, segundo referiram Stanley<sup>29</sup> (1995), Balmain & Harris<sup>2</sup> (2000) e Ide et al.<sup>18</sup> (2002). Em nosso levantamento bibliográfico a participação dos genes *ras*, p53, p16 e Rb é aludida somente para experimentos com camundongos (STANLEY<sup>29</sup>, 1995; BALMAIN & HARRIS<sup>2</sup>, 2000; IDE et al.<sup>18</sup>, 2002). Segundo Balmain & Harris<sup>2</sup> (2000), os camundongos apresentam-se como boas cobaias para carcinogênese. Nestes animais, a indução de cânceres ocorre por falhas na reparação do DNA. Nota-

se, então, carência evidente de estudo genético no que se refere aos ratos e às suas neoplasias glandulares salivares induzidas. Todavia, pela rápida formação de lesões em nosso estudo, podemos especular que a reparação genética deficiente em ratos expostos a carcinógenos pode ser semelhante a dos camundongos.

Os modelos animais de carcinogênese química foram e tem sido extensamente estudados. Os objetivos relacionados à indução de tumores em animais se prestam ao estudo da carcinogênese *per se* e de drogas e substâncias às quais o homem pode ter contato voluntário ou não. Estes conceitos foram apresentados por Franks<sup>12</sup> (1990) e Fassoni et al.<sup>11</sup> (1993) e são válidos para a pesquisa em questão pois esta, além de outros objetivos, intenciona o entendimento dos eventos da carcinogênese experimental de glândulas salivares. Os animais que se prestaram ao nosso estudo de carcinogênese experimental foram tratados de forma adequada, levando-se em consideração os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foram mantidos em grupos de sete animais, recebendo alimentação e hidratação *ad libitum*. Não se pretendeu estudar qualquer resposta sistêmica do hospedeiro às neoplasias experimentais fora do escopo da revisão da literatura.

Os autores que estudam oncogênese quimicamente induzida em glândulas salivares animais descrevem achados muitas vezes conflitantes. Eles divergem quanto aos modelos animais e, às vezes, quanto às lesões causadas em um mesmo modelo utilizando-se a mesma metodologia. Estas discrepâncias sugerem ser, a carcinogênese em glândulas salivares, de difícil reprodução.

Entretanto, os autores concordam que as várias metodologias estudadas podem revelar achados muito diferentes. Uma das hipóteses recai sobre inerências de cada espécie animal utilizada (STANDISH<sup>28</sup>, 1957; CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966; TURBINER & SHKLAR<sup>34</sup>, 1969; SHKLAR<sup>27</sup>, 1970; TAKEUCHI et al.<sup>32</sup>, 1975; EL-MOFTY<sup>8</sup>, 1977).

A carcinogênese quimicamente induzida em glândulas salivares pode ser conduzida levando-se em consideração várias metodologias. Os modelos animais diferem entre autores. Assim posto, podem ser utilizados cobaias como rato (CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964; CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966; SCHMUTZ & CHAUDHRY<sup>25</sup>, 1969; TURBINER & SHKLAR<sup>34</sup>, 1969; EL-MOFTY<sup>8</sup>, 1977; ZAMAN et al.<sup>40</sup>, 1996; ENZMANN et al.<sup>10</sup>, 1998), hamster (CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966) e camundongo (WIGLEY & CARBONELL<sup>37</sup>, 1976; TAKAI et al.<sup>31</sup>, 1984; HINDY et al.<sup>17</sup>, 1995; TSUJIMOTO et al.<sup>33</sup>, 1999; YURA et al.<sup>39</sup>, 2001). Os coelhos são citados por Standish<sup>28</sup> (1957), Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964) e Shklar<sup>27</sup> (1970) como animais utilizados por Steiner, em 1942, juntamente com ratos, hamsters e camundongos. Os experimentos de nossa pesquisa foram conduzidos em ratos. Estes animais se apresentaram como bons modelos animais. Seu manuseio não foi complicado e não existiu necessidade de muitos cuidados em relação à sua alimentação e hidratação. O controle clínico dos animais também pôde ser levado a curso sem complicações. Sua anatomia e histologia glandular foram de fácil reconhecimento, proporcionando o estudo macroscópico e microscópico das lesões.

Em carcinogênese glandular, os diferentes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dentre eles o DMBA, podem ser implantados (CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964; CHAUDHRY et al.<sup>5</sup>, 1966; TURBINER & SHKLAR<sup>34</sup>, 1969; EL-MOFTY<sup>8</sup>, 1977; HINDY et al.<sup>17</sup>, 1995) ou injetados (SCHMUTZ & CHAUDHRY<sup>25</sup>, 1969; WIGLEY & CARBONELL<sup>37</sup>, 1976; TAKAI et al.<sup>31</sup>, 1984; ZAMAN et al.<sup>40</sup>, 1996; TSUJIMOTO et al.<sup>33</sup>, 1999; OGAWA et al.<sup>23</sup>, 2000; YURA et al.<sup>39</sup>, 2001) por meio de procedimento cirúrgico de exposição do órgão glandular ou não. Na presente pesquisa optou-se pela cirurgia do animal por meio de uma incisão modificada. Ao invés de um corte cervical central utilizamos uma abordagem cirúrgica por incisão paramediana esquerda. Assim, conseguimos evidenciar a glândula submandibular esquerda sem a necessidade de extensa divulsão.

Existem marcadas incongruências no que concerne ao uso de *pellets* de DMBA. Não são fornecidos dados consistentes em relação às dimensões, à forma e a maneira de se confeccionar estes implantes. Alguns autores somente citam uma ou duas características quaisquer do *pellet*, como Chaudhry e al.<sup>5</sup> (1969) que apresentam a dimensão de 1mm<sup>3</sup> e o veículo sendo propilenoglicol. Uma vez que as descrições sobre implantação de *pellets* de DMBA são parcamente ilustradas, decidiu-se pela utilização da injeção de DMBA em acetona, por ser este procedimento mais fácil de ser reproduzido e conduzido.

Em relação à indução de tumores por meio de injeção de DMBA, nota-se, claramente, a não uniformidade dos estudos. As concentrações de DMBA variaram de 0,1% a 4% conforme aludiu

Hindy et al.<sup>17</sup> (1995), sempre em volume constante de 0,05ml. Outros autores apontaram para concentrações de 1% (TSUJIMOTO et al.<sup>33</sup>, 1999; IDE et al.<sup>19</sup>, 2004) e 2% (SCHMUTZ & CHAUDHRY<sup>25</sup>, 1969). Os veículos utilizados também diferem entre pesquisadores. Schmutz & Chaudhry<sup>25</sup> (1969) utilizaram uma solução vaselinada de DMBA. Uma emulsão com KY gel e DMBA pode ser preparada, segundo Wigley & Carbonell<sup>37</sup> (1976). Para Takai et al.<sup>31</sup> (1984), o óleo de oliva foi a substância veicular de eleição. Zaman et al.<sup>40</sup> (1996) e Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000), associaram o DMBA à acetona. Em nossos experimentos, a acetona foi utilizada para a dissolução do DMBA. Obtivemos uma boa solução para veicular 0,1ml de DMBA a 2% nas glândulas submandibulares dos ratos.

Não há dissonância na história natural dos carcinomas induzidos através de implantação de DMBA na forma de *pellets*. As fases degenerativa, proliferativa, metaplásica e neoplásica maligna foram primeiramente apontadas por Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964) e confirmadas pelos autores que os sucederam. Contudo, a gênese das lesões causadas por injeção de carcinógeno não foi, ainda, referida na literatura. A ocorrência de outras neoplasias também não foi acompanhada das descrições de sua história natural. Sob forma de crítica, Ogawa et al.<sup>23</sup> (2000) reportam que Zaman et al.<sup>40</sup> (1996) não se interessaram em descrever as características dos adenocarcinomas induzidos por DMBA, tão pouco seus constituintes celulares.

A história natural das neoplasias induzidas em nossos experimentos, em contraste com os achados de Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), pôde evidenciar semelhanças e diferenças, conforme se segue. A fase

degenerativa foi percebida no primeiro grupo de nosso experimento, através do reconhecimento de necrose e reação inflamatória polimorfonuclear com apagamento das estruturas acinares e persistência dos ductos. Todavia, preferiu-se a denominação de sialadenite crônica uma vez que este quadro histológico pareceu-nos traduzir melhor as manifestações histomorfológicas presentes. A ocorrência de células gigantes percebida por Standish<sup>28</sup> (1957) na primeira fase da implantação de DMBA não foi verificada. Estes achados se mostraram ocasionais no terceiro grupo de sacrifício de nossos ratos.

A segunda fase, denominada proliferativa por Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), foi marcada por proliferação de epitélio ductal, formação de cistos acompanhados de displasias epiteliais e elementos carcinomatosos ao redor dos *pellets* de DMBA, em estroma hialinizado. O segundo grupo de sacrifício de nosso experimento evidenciou um caso de atipia celular ductal, dois casos de carcinoma epidermóide e quatro casos de sialadenite crônica. Pareceu-nos que nossos achados não se distanciaram muito daqueles do referencial teórico. Todavia, achamos muito importante adicionar dados referentes ao estroma conjuntivo. A histopatologia das lesões avaliadas por nós evidenciou ocasional desmoplasia, pleomorfismo celular fibroblástico e proliferação eventual de estruturas nervosas. Critica-se a pouca consideração do estroma nas descrições dos autores como Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), Turbiner & Shklar<sup>34</sup> (1969) e Shklar<sup>27</sup> (1970).

A terceira fase, denominada metaplásica, foi caracterizada pela presença de metaplasia escamosa nas paredes dos cistos, ocorrência de hiperplasia epitelial e profusão na produção de ceratina (CATALDO et al.<sup>3</sup>, 1964). Nossas avaliações, entretanto, apontaram para lesões com características mais definidas. Ao invés de uma fase com figuras de metaplasia, encontramos imagens celulares e teciduais de neoplasias. Assim sendo, diagnosticamos dois casos de carcinoma e quatro casos de carcinossarcoma. Vale lembrar que a não observação do estroma não nos permitiria o diagnóstico das neoplasias malignas mistas, ou seja, os carcinossarcomas. Um caso de hiperemia foi diagnosticado, sem ser acompanhado de atipias.

A última etapa, conhecida por fase neoplásica maligna foi identificada pela ocorrência de carcinomas epidermóides (CATALDO et al.<sup>3</sup>,1964). Para o nosso estudo, fica claro que na ocasião do terceiro sacrifício, nossa pesquisa já se apresentava próxima da fase neoplásica maligna. O quarto grupo estudado por nós apresentou um caso de carcinoma, um caso de sarcoma e três casos de carcinossarcoma. Novamente, faz-se mister recordar a importância na observação do estroma conjuntivo. Fica evidente, também, que as neoplasias induzidas experimentalmente podem ser bifásicas, associando carcinoma e sarcoma. Dois animais apresentaram-se com sinais histológicos de hiperemia e ausência de atipias celulares.

Cataldo et al.<sup>3</sup> (1964), apesar de não considerarem a formação de neoplasias mesenquimais em seu estudo, fazem alusão a uma hialinização peri-implante de *pellet* de DMBA. Suas descrições contemplam a presença sempre constante de fibroblastos atípicos,

principalmente nos últimos grupos de animais sacrificados. Um caso de alterações teciduais sarcomatosas também é citado por estes autores. Se mostra patente a não valorização das atipias celulares fibroblásticas. Talvez por que, segundo Alvarez-Cañas & Rodilla<sup>1</sup> (1996), o reconhecimento de tumores mistos malignos (carcinossarcomas) só se deu em 1967, com King.

Segundo Wigley & Carbonell<sup>37</sup> (1976), a carcinogênese de glândulas salivares em camundongos pode produzir carcinomas e fibrossarcomas síncronos. Estes autores concluíram que as lesões não têm relação entre si. Faz-se mister lembrar que em 1984, Takai et al.<sup>31</sup> apontaram ocorrências de carcinomas associados a sarcomas. Estes autores denominaram o encontro destas figuras histopatológicas como “tumores de colisão”. A mais recente classificação de tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS), reconhece uma neoplasia glandular com aspectos carcinomatosos e sarcomatosos denominada carcinossarcoma (GNEPP<sup>13</sup>, 2005). A pesquisa por nós conduzida revelou a associação de sarcomas a carcinomas em 25% dos casos relativos à carcinogênese por DMBA em 28 ratos. Estes animais foram diagnosticados como portadores de carcinossarcomas, em total acordo com a classificação da OMS.

O estudo experimental de neoplasias salivares animais é pertinente uma vez que os tumores primitivos de glândulas salivares em humanos são relativamente raros. Todavia, a carcinogênese química, apesar de servir ao propósito de permitir o estudo de neoplasias induzidas, não deve ter seus resultados sempre extrapolados para os seres humanos. Um exemplo deste fato pode ser

verificado no que concerne à carcinogênese de pulmão em camundongos cepa A. As neoplasias podem ser induzidas com substâncias diferentes, como o 4NQO, dieta de gorduras ou ferro e inalação de cloreto de sódio e exposição oral ao glicerol (ENZMANN et al.<sup>10</sup>, 1998).

É importante lembrar que as neoplasias diagnosticadas nos animais pesquisados por nós constituem lesões primitivas extremamente raras em parênquimas glandulares humanos. O carcinoma de células escamosas é diagnosticado em menos de 1% dos casos (DARDICK<sup>7</sup>, 1996; LEWIS & OLSEN<sup>21</sup>, 2005; SHAPIRO & BHATTACHARYYA<sup>26</sup>, 2006). Os sarcomas respondem por 0,3% das neoplasias malignas (GNEPP<sup>14</sup>, 2005) e os carcinossarcomas por 0,16% dos casos (ALVAREZ-CAÑAS & RODILLA<sup>1</sup>, 1996). Uma vez que as manifestações destas neoplasias não são esperadas em nosologia tumoral humana, fica patente a importância da carcinogênese experimental para ofertar material de estudo.

A histopatologia dos carcinomas em humanos, descrita por Dardick<sup>7</sup> (1996), parece-nos guardar semelhanças importantes em relação aos tumores induzidos quimicamente em animais. O reconhecimento de metaplasia e displasia escamosa ductal, além das figuras carcinomatosas nos remete aos quadros histológicos dos ratos estudados. A presente pesquisa foi capaz de evidenciar casos de carcinossarcomas não valorizados pelos autores consultados. No caso do sarcoma e nos casos de carcinossarcomas, entendemos que há a necessidade de se escutar as peculiaridades de cada lesão, com o

intuito de se conhecer os reais componentes mesenquimais das neoplasias em questão.

## 7 CONCLUSÃO

Contrastando-se os dados clínicos e histológicos obtidos com o referencial teórico, pôde-se concluir que:

- a) a carcinogênese experimental em glândulas submandibulares de ratos, por meio de injeção de DMBA, se apresentou como uma metodologia viável na indução de neoplasias glandulares;
- b) a metodologia de injeção de DMBA em glândulas salivares de ratos é segura, uma vez que a indução se faz em um único tempo cirúrgico;
- c) a maioria dos autores consultados não fez referências ou não interpretou de maneira acurada os próprios resultados histológicos no que se refere a participação do estroma conjuntivo em suas neoplasias induzidas;
- d) a ocorrência de carcinossarcomas deve ser considerada no diagnóstico das neoplasias salivares induzidas por DMBA intra-glandular, em modelo experimental;

e) os padrões histológicos neoplásicos evidenciados em nosso experimento foram: sarcoma, carcinoma epidermóide e carcinossarcoma.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- 1 ALVAREZ-CAÑAS, C.; RODILLHA, I.G. True malignant mixed tumor (carcinosarcoma) of the parotid gland. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.81, n.4, p.454-8, Apr. 1996.
- 2 BALMAIN, A.; HARRIS, C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.371-7, Mar. 2000.
- 3 CATALDO, E.; SHKLAR, G.; CHAUNCEY, H.H. Experimental submaxillary gland tumors in rats. **Arch Pathol**, v.77, p.305-16, Mar. 1964.
- 4 CHANDAN, V.S. et al. Primary pleomorphic lipossarcoma of the parotid gland: a case report and review of the literature. **Am J Otolaryngol**, v.25, n.6, p.432-7, Nov/Dec. 2004.
- 5 CHAUDHRY, A.P.; LIPOSKY, R; JONES, J. Dose-response of submandibular glands to carcinogen pellets in rats and hamsters. **J Dent Res**, v.45, n.5, p.1548-50, Sept./Oct. 1966.

---

\* Baseado em:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Informação e documentação**: referências, elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002.23p.

- 6 CIAPPARELLI, L.; RETIEF, D.H.; FATTI, L.P. The effect of zinc on 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA) induced salivary gland tumours in the albino rat – a preliminary study. **S Afr J Med Sci**, v.37, n.3, p.85-90, Dec. 1972.
- 7 DARDICK, I. **Color atlas/text of salivary gland tumor pathology**. New York: Igaku-Shoin, 1996. 274p.
- 8 EL-MOFTY, S. Chemical carcinogenesis in the rat submandibular gland. **Egypt Dent J**, v.23, n.2, p.65-75, Apr. 1977.
- 9 EL-MOFTY, S. Spontaneous regression of induced parotid gland tumors in rats. **Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.45, n.3, p.431-9, Mar. 1978.
- 10 ENZMANN, H. et al. Short- and intermediate-term carcinogenicity testing – a review part 2: available experimental models. **Food Chem Toxicol**, v.36, n.11, p.997-1013, Nov. 1998.
- 11 FASSONI, A.A.; SALLES, C.L.F.; CONSOLARO, A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. **Rev Odontol USP**, v.7, n.4, p.285-91, 1993.

- 12 FRANKS, L.M. O que é câncer. In: FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. Trad. M.M. Brentani; R. Chamas. São Paulo: Roca, 1990. Cap.1, p.1-24.
- 13 GNEPP, D.R. Carcinosarcoma. In: BARNES, L. et al. **Pathology and genetics, head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p.244 (World Health Organization Classification of Tumours).
- 14 GNEPP, D.R. Soft tissue tumours. In: BARNES, L. et al. **Pathology and genetics, head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p.275 (World Health Organization Classification of Tumours)
- 15 GNEPP, D.R.; WENIG, B.M. Malignant mixed tumours. In: ELLIS, G.L; AUCLAIR, P.L.; GNEPP, D.R. **Surgical pathology of the salivary glands**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. Cap. 20, p.350-68.
- 16 GRIFFIN, B.E. Estrutura do DNA e sua relação com a carcinogênese. In: FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. Trad. M.M. Brentani; R. Chamas. São Paulo: Roca, 1990. Cap.6, p.107-25.

- 17 HINDY, A.M.; SHAKER, M.A; MOUNIR, R.M.  
Carcinogenesis of mouse submandibular salivary gland using DMBA implant. **Egypt Dent J**, v.41, n.2, p.1195-202, Apr. 1995.
- 18 IDE, F. et al. Reduction of p53 dosage renders mice hypersensitive to 7, 12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced salivary gland tumorigenesis. **Anticancer Res**, v.22, n.1A, p.201-4, Jan./Feb. 2002.
- 19 IDE, F. et al. Skin and salivary gland carcinogenicity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene is equivalent in the presence or absence of aryl hydrocarbon receptor. **Cancer Lett**, v.214, n.1, p.35-41, Oct. 2004.
- 20 KARIYA, S. et al. Malignant fibrous histiocytoma of the parotid gland. **Auris Nasus Larynx**, v.30, n.3, p.315-8, Aug. 2003.
- 21 LEWIS, J.E.; OLSEN, K.D. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. **Pathology and genetics, head an neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p.245-6 (World Health Organization Classification of Tumours).

- 22 ODUKOYA, O.; SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.58, n.3, p.315-20, Sept. 1984.
- 23 OGAWA, Y. et al. Induction of adenocarcinoma containing myoepithelial cells in rat submandibular gland by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. **Virchows Arch**, v.437, n.3, p.314-24, Sept. 2000.
- 24 RODRIGUES, M.A.M; CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 13, p.223-40.
- 25 SCHMUTZ, J.A.; CHAUDHRY, A. P. Incidence of induced tumors in the rat submandibular gland with different doses of 7, 12 – dimethylbenz – ( $\alpha$ ) – anthracene. **J Dent Res**, v.48, n.6, p. 1316, Nov./Dec.1969.
- 26 SHAPIRO, N.L.; BHATTACHARYYA, N. Clinical characteristics and survival for major salivary gland malignancies in children. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.134, n.4, p. 631-4, Apr. 2006.
- 27 SHKLAR, G. Recent advances in experimental oral and salivary gland tumors. **J Oral Surg**, v.28, n.7, p.495-500, July. 1970.

- 28 STANDISH, S.M. Early histologic changes in induced tumors of the submaxillary salivary glands of the rat. **Am J Pathol**, v.33, n.4, p.671-89, July 1957.
- 29 STANLEY, L.A. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. **Toxicology**, v.96, n.3, p.173-94, Feb. 1995.
- 30 SUMITOMO, S; HASHIMURA, K; MORI, M. Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands – an immunohistochemical evaluation. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v.32B, n.2, p.97-105, Mar. 1996.
- 31 TAKAI, Y. et al. Histopathologic studies of DMBA-induced mouse submandibular-gland tumors with or without cryoprobe treatment. **J Oral Pathol**, v.13, n.4, p.419-28, Aug. 1984.
- 32 TAKEUCHI, J. et al. Histological changes in the submandibular glands of rats after intraductal injection of chemical carcinogens. **Acta Pathol Jpn**, v.25, n.1, p.1-13, Jan. 1975.
- 33 TSUJIMOTO, H. et al. Effect of epidermal growth factor administration on the development of mouse salivary gland carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.1, p.30-6, Jan. 1999.

- 34 TURBINER, S.; SHKLAR, G. Variations in experimental carcinogenesis of submandibular gland in three strains of rats. **Acta Oral Biol**, v.14, n.9, p.1065-71, Sept. 1969.
- 35 WEISBURGER, E.K. General principles of chemical carcinogenesis. In: WAALKES, M.P.; WARD, J.M. **Carcinogenesis**. New York: Raven Press, 1994. Cap.1, p.1-2.
- 36 WIGLEY, C. Carcinogênese química e lesões pré-cancerosas. In: FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. Trad. M.M. Brentani; R. Chamas. São Paulo: Roca, 1990. Cap.7, p.127-48.
- 37 WIGLEY, C.B.; CARBONELL, A.W. The target cell in the chemical induction of carcinomas in mouse submandibular gland. **Europ J Cancer**, v. 12, n.9, p.737-41, Sept. 1976.
- 38 WOOLF, N. Oncogenesis In: \_\_\_\_ **Pathology, basic and systemic**, London: W.B. Saunders, 1998. Cap. 29, p.290-304.
- 39 YURA, Y. et al. Enhancing effect of fibroblast growth factor on the proliferation of salivary gland carcinoma cells and salivary gland carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, v 30, n.3, p.159-67, Mar. 2001.

40 ZAMAN, A. et al. Induction of adenocarcinomas in the submandibular salivary glands of female Wistar rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Archs Oral Biol**, v.41, n.2, p.221-4, Feb. 1996.

## Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz  
CEP 12201-970 - F. (12) 5947-9024  
Fax: (12) 3947-9010 / vice-diretor@fojoc.unesp.br

---

**CERTIFICADO**  
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº 038/2004-PA/CEP, sobre “**Carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (Rattus Norvegicus)**”, sob a responsabilidade de **LUIS EDUARDO BLUMER ROSA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 08 de dezembro de 2004.

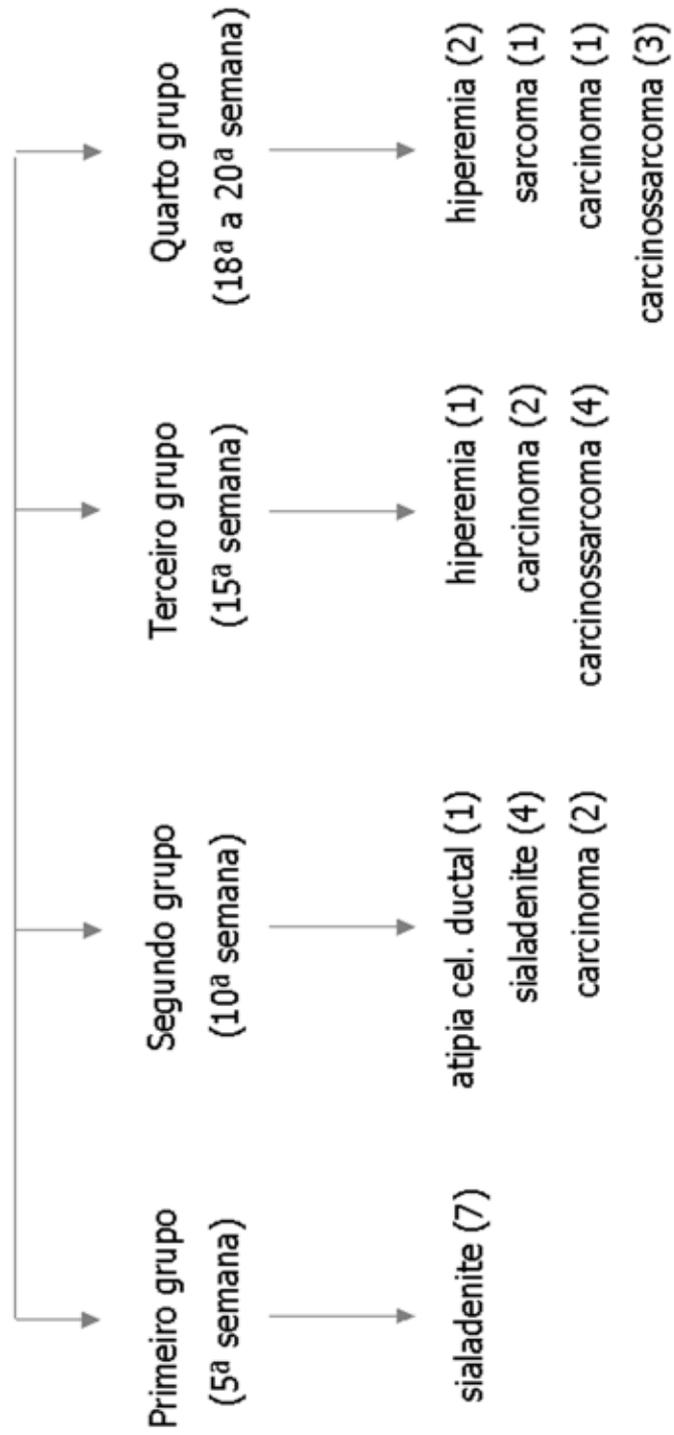


---

**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

Anexo B – Resultados dos diagnósticos histopatológicos

# 28 ratos



MAINENTI, P. **Chemical carcinogenesis in rat (*rattus norvegicus*) submandibular gland using DMBA.** 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, área Biopatologia Bucal)-Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

### ABSTRACT

The carcinogenesis consists in a process in which the direct contact between cells and some physical, chemical or biological agents results in cell malignization. In the scope of experimental salivary gland carcinogenesis there is a consensus in the use of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) as carcinogens. The 7,12 – dimethylbenzanthracene (DMBA) is the most used PAH. This paper aims the investigations of the DMBA injected in rats submandibular glands. For this purpose, 28 rats (*Rattus norvegicus*), three months old (300 gr. weight, approximately) were used. The animals were divided into four groups of seven each. All animals were anesthetized and shaved in the neck. After antisepsis, one ventral neck incision, followed by dissection was performed in each animal. The left submandibular gland was injected with 0.1 ml of 2% DMBA in acetone. The skin was closed with 3-Ø silk suture. By the end of the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> weeks the animals were sacrificed by lethal doses of anesthetics. The results in the 5<sup>th</sup> week presented seven cases of chronic sialadenitis. After 10 weeks one case of ductal cell atypia was evident, two cases of squamous cell carcinoma and four cases of chronic sialadenitis were also seen. Between the 15<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> weeks the cases were diagnosed as follows: three cases of hyperemia, three cases of squamous cell carcinoma, one case of sarcoma and seven cases of carcinosarcoma. The data analysis showed 3.6% of cellular atypia, 3.6% of sarcoma, 10.7% of hyperemia, 17.9% of squamous cell carcinoma, 25% of carcinosarcoma and 39.4% of chronic sialadenitis. Conclusion: the results allowed the investigation of the glandular carcinogenesis natural history after DMBA injection, from the beginning of inflammatory changes to the neoplastic manifestation of mesenchymal, epithelial and mixed tumours.

KEYWORDS: Carcinogenesis, salivary gland, DMBA, neoplasia.

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

São José dos Campos, 19 de setembro de 2006.

**PIETRO MAINENTI**