

Graziela de Oliveira Semenzati

**ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DAS
PROTEÍNAS P53 E KI-67 NAS MUCOSAS DA LÍNGUA,
FARINGE E LARINGE DE RATOS EXPOSTOS À
INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO**

Orientadora: Profa. Livre Docente Regina Helena Garcia Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP para obtenção de Título de Doutor em Cirurgia.

Botucatu
2012

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

Semenzati, Graziela de Oliveira.

Estudo histológico e imunohistoquímico das proteínas p53 e ki-67 nas mucosas da língua, faringe e laringe de ratos expostos à inalação da fumaça de cigarro / Graziela de Oliveira Semenzati. - Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Regina Helena Garcia Martins

Capes: 40102149

1. Mucosa bucal – Câncer. 2. Cigarros. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Fumaça – Efeito fisiológico.

Palavras-chave: Boca; Cavidade oral; Estudo experimental; Estudo morfológico e imunohistoquímico; Faringe; Laringe; Ratos; Tabagismo passivo.

Agradecimentos

Aos professores do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço que participaram da minha formação profissional.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da UNESP, em especial ao Dr. **Marcos Minicucci** e Dra. **Bertha Polegati** pela colaboração nas atividades desenvolvidas no laboratório experimental do Serviço de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Aos funcionários do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da UNESP, **Cinthia Scolastico Cecílio de Souza** e **Nilse Ribeiro da Silva**, pelas inúmeras colaborações nas atividades burocráticas.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental, **Marta Regina Russo Sarzi**, **Vitor Marcos de Souza** e **Mário Carlos Alberto Martins**, pelas colaborações na fase da experimentação da pesquisa.

À Professora Dra. **Noeme Sousa Rocha** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP) Campus de Botucatu, pela valiosa orientação nas análises histológicas.

À professora Dra. **Selma Maria Michelin Matheus** do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP pelas orientações nas análises histomorfométricas.

À professora. Dra. **Lídia Raquel de Carvalho**, professora do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP pelas análises estatísticas.

Ao Dr. **Alexandre Todorovic Fabro**, médico patologista e pós-graduando do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP pelas contribuições nas análises histopatológicas.

Ao colega **Breno Souza Salgado**, médico veterinário e pós-doutorando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp) Campus de Botucatu pela colaboração na padronização dos estudos imunohistoquímicos.

Às pessoas não citadas, cujo ajuda jamais me faltaram, meu pedido de desculpas e a certeza de que a omissão se restringe a estas páginas.

À todos, minha eterna gratidão.

Aos meus Familiares, meus pais **Orlando Braz Semenzati** e **Rosa de Oliveira Semenzati** pelo imenso amor dispensado. Aos meus irmãos **Taís de Oliveira Semenzati Marson** e **Breno Luís de Oliveira Semenzati** pelo carinho. Ao meu marido **Hamilton Modesto Rigato** pelo companheirismo, compreensão e incentivo na trajetória deste trabalho e da minha vida.

À professora **Regina Helena Garcia Martins**, pela dedicação em toda a minha formação como otorrinolaringologista e em especial nesta etapa, a qual demonstra uma imensurável e contagiante dedicação à pesquisa e rigoroso conhecimento científico, indispensável para a realização deste trabalho. Não poderia deixar de expressar meu imenso respeito e amor.

Epígrafe

Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.

Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.

Aristóteles.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	11
Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas.....	17
Resumo.....	19
Abstract.....	22
1. Introdução.....	25
2. Objetivos.....	42
3. Material e Métodos.....	44
3.1 Animais utilizados.....	45
3.2 Ambiente de experimentação.....	45
3.3 Grupos Experimentais.....	46
3.4 Seqüências das etapas experimentais.....	47
3.4.1 Exposição à Fumaça do Cigarro.....	47
3.4.2 Procedimentos da eutanásia e realização das biópsias.....	48
3.4.3 Preparo das lâminas histológicas e exame de microscopia de luz.....	50
3.4.4 Análise histomorfométrica.....	51
3.4.5 Estudo imunohistoquímico.....	52
3.4.6 Metodologia estatística.....	55
4. Resultados.....	56
4.1 Estudo de microscopia de luz.....	57
4.1.1 Superfície da língua.....	57
4.1.2 Superfície da faringe.....	62
4.1.3 Superfície da laringe.....	66
4.2 Estudo morfométrico.....	70
4.3 Estudo Imunihistoquímico.....	71
5. Discussão.....	79
6. Conclusão.....	92
7. Referências.....	94
8. Anexo.....	108

Lista de Abreviaturas

Bcl-2 -	gene células linfócito B Leucemia-Linfoma
CEC -	Carcinoma espinocelular
°C -	Grau Celsius
DMBA -	7,12-dimetil-benz[a]antraceno
H&E -	Hematoxilina-Eosina
HPV -	Papiloma vírus humano
IARC -	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC -	Intervalo de Confiança
INCA -	Instituto Nacional do Câncer
mg -	Miligramas
mg/m ³ -	Miligramas/metros cúbicos
OD -	Odds ratio
OMS (WHO) -	Organização Mundial de Saúde
P -	nível de significância
TPM/m ³ -	Total de partículas materiais por metro cúbico
µm -	micrômetro
4NQO -	4-Nitroquinolina-1-Óxido

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema representativo das diversas ações do p53 sobre a célula danificada.....	36
Figura 2.	Metodologia de oferta de líquidos e de ração aos animais do experimento.....	46
Figura 3.	Aparelho de fumar: em a, detalhes do local de adaptação dos cigarros; em b, detalhes da conexão do aparelho de fumar à câmara onde estão os animais expostos à fumaça.....	47
Figura 4.	Detalhes da metodologia da experimentação para exposição dos animais à inalação da fumaça de cigarro. À esquerda da figura está posicionada a máquina de fumar e à direita a câmara com os animais.....	48
Figura 5.	Técnica de dissecação mediana e ressecção da mandíbula dos animais para remoção em bloco do segmento da língua, faringe, laringe e traquéia cervical.....	49
Figura 6.	Peça identificada com os pontos das biópsias (a). Segmento em bloco da laringe em detalhe (b).....	50
Figura 7.	Microscópio de Luz utilizado para as análises histológicas (Carl Zeiss do Brasil Ltda).....	51
Figura 8.	Microscópio utilizado para a digitalização das imagens (a). Detalhe da câmera fotográfica (b).....	52
Figura 9.	Superfície de língua de animal do grupo controle (GC). Detalhe da camada de queratina sobre as papilas filiformes (seta) e da estreita faixa de lâmina própria. Grânulos intracitoplasmáticos hipercromados nas células distais (seta pontilhada). Microscopia de luz, H&E (40X).....	60
Figura 10-	Superfície dorsal da língua de animal do grupo Tabaco (GT). Detalhes da camada de queratina sobre as papilas (seta contínua). Células basais em intensa proliferação e displasia leve (seta pontilhada), membrana basal e estreita faixa de lâmina própria. Microscopia de Luz, H&E (40 X).....	60
Figura 11 –	Superfície dorsal de animal do grupo Tabaco (GT). Camada de queratina mais desenvolvida sobre as papilas filiformes (seta contínua), vasos dilatados na lâmina própria (seta pontilhada) e área de displasia focal de grau leve (seta espessa). Microscopia de luz, H&E (40X).....	61
Figura 12 –	Superfície dorsal de animal do grupo Tabaco (GT). Detalhes de camada de queratina (seta contínua). Microscopia de luz, H&E (40X).....	61
Figura 13.	Epitélio de cobertura da região da faringe de animais do grupo controle (GC). Destaque para a espessa camada de queratina sobre o epitélio (seta contínua) e para as glândulas seromucosas mergulhadas na lâmina própria (seta pontilhada). Microscopia de Luz, H&E (40 X).....	64

Figura 14.	Epitélio de cobertura da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Destaque para a hiperplasia de células basais (seta contínua), congestão vascular e áreas focais de displasia (seta descontínua). Microscopia de luz, H&E (40X).....	64
Figura 15.	Superfície de faringe de animal do grupo Tabaco (GT). Áreas com hiperplasia de células basais (seta contínua) e displasia focal de grau leve (seta pontilhada). Microscopia de luz, H&E (40X).....	65
Figura 16.	Epitélio de cobertura da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Observa-se área focal de displasia moderada (seta). Microscopia de luz, H&E (80X).....	65
Figura 17.	Corte histológico de fragmento de laringe de animais do grupo controle (GC). Observa-se epitélio pavimentoso estratificado da laringe recoberto por estreita camada de queratina em toda a sua extensão (seta contínua) e lâmina própria rica em tecido conjuntivo. Microscopia de Luz, H&E (40 X).....	68
Figura 18.	Corte histológico da laringe de animais do grupo Tabaco (GT), sendo observada congestão vascular mais intensa (setas) e infiltrado de células inflamatórias (seta descontínua). Microscopia de Luz, H&E (40 X).....	68
Figura 19.	Corte histológico da laringe de animais do grupo Tabaco (GT), sendo observada proliferação de células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, H&E (80 X).....	69
Figura 20-	Epitélio da laringe de animais do grupo Tabaco (GT). Destaque para área de displasia focal de grau leve (seta). Microscopia de Luz, H&E (80 X).....	69
Figura 21-	Boxplot da média (M) e Desvio Padrão (DP) da altura da camada de queratina nos três sítios estudados em ambos os grupos.....	70
Figura 22.	Epitélio da língua de animais do grupo controle (GC). Imunomarcção do anticorpo Ki-67 mostrando coloração acastanhada dos núcleos apenas das células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).....	72
Figura 23.	Epitélio da língua de animais do grupo Tabaco (GT). Imunomarcção do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).....	72
Figura 24.	Epitélio da língua de animais do grupo Tabaco (GT). Imunomarcção do anticorpo Ki-67abrangendo células da camada basal e parabasal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).....	73
Figura 25.	Epitélio da faringe de animais do grupo controle (GC). Ausência de imunomarcção do anticorpo p 53. Microscopia de Luz, (80 X).....	74

Figura 26.	Epitélio da faringe de animais do grupo controle (GC). Ausência de imunomarcacão do anticorpo Ki-67. Microscopia de Luz, (40 X). Hiperplasia na microscopia de luz com imunoexpressão negativa.....	75
Figura 27.	Epitélio da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Imunomarcacão do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal. Microscopia de Luz, (40 X).....	75
Figura 28.	Epitélio da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Imunomarcacão do anticorpo Ki-67abrangendo células da camada basal e algumas células parabasais (seta). Microscopia de Luz, (80 X).....	76
Figura 29-	Epitélio da laringe de animais do grupo Tabaco (GT). Ausência de imunomarcacão do anticorpo p 53. Microscopia de Luz, (80 X).....	77
Figura 30-	Epitélio da laringe de animais do grupo controle (GC). Imunomarcacão do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (40 X).....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Resultado das análises histológicas da superfície da língua em ambos os grupos.....	59
Tabela 2.	Resultado das análises histológicas da superfície da faringe em ambos os grupos.....	63
Tabela 3.	Resultado das análises histológica dos fragmentos de laringe nos grupos de estudo.....	67
Tabela 4.	Análise morfométrica da altura da camada de queratina em ambos os grupos. Média e desvio-padrão referentes às variáveis segundo grupo.....	70
Tabela 5.	Imunoexpressão dos anticorpos P53 e Ki-67 nos fragmentos de língua.....	71
Tabela 6.	Imunoexpressão dos anticorpos P53 e Ki- 67 nos fragmentos de faringe.....	74
Tabela 7.	Imunoexpressão dos anticorpos P53 e Ki- 67 nos fragmentos de laringe.....	77

Resumo

INTRODUÇÃO: O câncer de cabeça e pescoço corresponde a 5% de todas as neoplasias malignas do organismo, sendo os sítios mais prevalentes a cavidade oral, faringe e laringe. O principal fator de risco é o tabagismo e o carcinoma espinocelular é o tipo histológico mais frequente. Marcadores de células tumorais como o p53 e Ki-67 têm sido estudados em tumores de cabeça e pescoço pela sua imunexpressão positiva para as células neoplásicas e em proliferação. Estudos experimentais possibilitam avaliar os efeitos nocivos do tabaco sobre as vias aéreas, sendo este o objetivo deste estudo. **OBJETIVOS:** Estudar, em ratos, os efeitos da exposição aguda à fumaça de cigarro sobre as mucosas da língua, faringe e laringe, por meio de análise histológica, morfométrica e imunohistoquímica da expressão das proteínas p53 e Ki-67. **MATERIAL E MÉTODO:** Ratos *Wistar* foram subdivididos em dois grupos de 20 animais cada: **grupo controle (GC)**, ração e água *ad libitum* e **grupo tabaco (GT)** expostos à inalação de fumaça de 40 cigarro/dia por 60 dias. Os animais foram eutanaziados e realizado biópsias da língua, faringe e laringe para os estudos histopatológico, histomorfométrico e imunohistoquímico das proteínas p53 e do ki-67. **RESULTADO:** As análises de microscopia de luz da língua dos animais do grupo tabaco (GT) revelaram algumas alterações mais marcantes nesse grupo em cada sítio, sendo que na língua, ganharam destaque a hiperplasia epitelial (GT-90%), hiperplasia de células da camada basal (GT-95%) e displasia epitelial de grau leve a moderado (GT-85%); na faringe, destacaram-se a hiperplasia de células da camada basal (GT-85%), as displasias (GT-25%) e a congestão vascular (GT-95%); na laringe predominaram hiperplasia das células da camada basal (GT-70%), hiperplasia epitelial (GT-55%), a congestão (GT-100%) e o infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares neutrófilos (GT-25%). O estudo morfométrico registrou valores mais elevados da camada de queratina nos animais do grupo tabaco (GT) do que nos do grupo controle

(GC), respectivamente: língua(64,4 μm e 54,2 μm) , faringe (20,6 μm e 16 μm) e laringe (21,8 μm e 16 μm). Nas análises imunohistoquímicas dos fragmentos da língua, faringe e laringe, a imunoexpressão da proteína foi negativa em ambos os grupos. A imunoexpressão positiva da proteína Ki-67 foi detectada em ambos os grupos, entretanto no grupo controle restringiu-se aos núcleos das células das camadas basais e no grupo tabaco estendeu-se também às células parabasais em algumas lâminas.

CONCLUSÕES: A exposição de animais à fumaça de cigarro durante 60 dias resultou em lesões benignas, identificadas pela microscopia de luz como hiperplasia epitelial, aumento da camada de queratina e displasia de grau leve, alterações estas mais evidentes nos fragmentos da língua e da faringe. O tempo de exposição não foi suficiente para desenvolver displasia de grau mais intenso ou neoplasia nos sítios examinados, justificando a imunoexpressão negativa da proteína p53 em todas as lâminas examinadas. A imunoexpressão mais marcante da proteína ki-67 reflete a resposta epitelial à agressão com proliferação celular.

Palavras-chave: Estudo experimental, Histologia, Ratos, Tabaco, Vias aéreas, p53, ki-67.

Abstract

INTRODUCTION: The head and neck cancer represents 5% of all malignant neoplasm of the body, with the sites most prevalent oral cavity, pharynx and larynx. The main risk factor is smoking and squamous cell carcinoma is the most frequent histological type. Tumor cell markers such as p53 and ki-67 have been studied in head and neck tumors by their positive immunostaining for proliferating and neoplastic cells. Experimental studies to assess the possible harmful effects of smoking on the airways which are the objective of this study. **OBJECTIVES:** To study the effects of acute exposure to cigarette smoke on the mucosa of the tongue, pharynx and larynx in rats; using histological, morphometric and immunohistochemical expression of p53 and ki-67. **MATERIALS AND METHODS:** Wistar rats were divided into two groups of 20 animals each control group (CG), food and water *ad libitum* and tobacco group (GT) exposed to inhalation of smoke from 40 cigarettes/day for 60 days. The animals were euthanized and biopsies of the tongue; pharynx and larynx were performed for histological studies, histomorphometric and immunohistochemical study of p53 and ki-67. **RESULTS:** The light of the tongue microscopy analysis showed in GT group: epithelial hyperplasia (GT-90%), hyperplasia of the basal cell layer (GT-95%) and dysplasia of mild to moderate (GT-85%); in pharynx, highlighted the hyperplasia of the basal cell layer (GT-85%), dysplasia (GT-25%) and vascular congestion (GT-95%); predominated in the larynx cell hyperplasia of the basal layer (GT-70%), epithelial hyperplasia (GT-55%), congestion (GT-100%) and inflammatory infiltration of polymorphonuclear neutrophils (GT-25%). The morphometric study identified high measures of the keratin layer in group Tobacco (GT) than in the control group (GC), respectively: tongue (64,4 μ m e 54,2 μ m), pharynx (20,6 μ m e 16 μ m) and larynx (21,8 μ m e 16 μ m). In immunohistochemical analysis of the fragments of the tongue, pharynx and larynx, the protein immunostaining was negative in both groups. The

positive immunostaining of ki-67 protein was detected in both groups, but in the control group was restricted to cell nuclei in the basal layers and tobacco group also extended to parabasal cells in some slides. **CONCLUSIONS:** The exposure of animals to cigarette smoke for 60 days resulted in benign lesions, identified by light microscopy as epithelial hyperplasia, increased keratin layer and mild dysplasia, these changes more evident in the fragments of the tongue and pharynx. The exposure time was not enough to develop severe dysplasia or cancer sites examined, justifying the negative immunostaining of p53 protein in all slides examined. The most marked immunostaining of the protein ki-67 reflects the epithelial response to injury with cell proliferation.

Keywords: Airways, Experimental study, Histology, Rats, Tobacco, p53, ki-67.

1. Introdução e Literatura

1. Aspectos epidemiológicos do câncer de boca, faringe e laringe

Dados epidemiológicos fornecidos pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) do *World Cancer Report* (2008) revelaram que em 2008 ocorreram 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os sítios mais incidentes foram pulmão (1,52 milhões), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido do câncer de estômago (780 mil óbitos) e de fígado (699 mil óbitos). Na América do Sul, Central e Caribe, no mesmo período, ocorreram cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o tipo de neoplasia mais comum foi o câncer de próstata, seguido do pulmão, estômago e cólon e reto; nas mulheres, o mais freqüente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (BOYLE et al., 2008).

No Brasil, às semelhanças das estimativas mundiais, o Instituto Nacional de Câncer-INCA-, sinaliza a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, nos anos de 2012 e 2013. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. (HASHIBE et al., 2009; INCA, 2009).

O câncer de cabeça e pescoço corresponde a 5% de todas as neoplasias malignas do organismo. É classificado, de acordo com a localização, em cavidade oral, faringe e laringe. A cavidade oral inclui os lábios, gengivas, os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, trígono retromolar e palato duro (CAMPOS et al., 2003). O câncer de boca está entre os dez cânceres mais freqüentes da região de cabeça e pescoço. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) apresentou uma estimativa de casos novos de

câncer de cavidade oral, para 2012 de 14.170, sendo 9.990 em homens e 4180 em mulheres. O número de mortes, de acordo com dados de 2008 foi de 6.214 (4.898 homens /1.316 mulheres).

A incidência do câncer de boca e faringe no Brasil encontra-se entre as mais elevadas do mundo, sendo que a região Sudeste apresenta taxa de incidência, ajustada por idade pela população mundial, de 25,3/100.000 em homens e 4,9/100.000 em mulheres (WUNSCH-FILHO, 2002). O comprometimento dos grupos etários mais jovens e de mulheres vem crescendo em decorrência da industrialização e universalização dos fatores de risco (LEITE *et al.*,1998).

São fatores de risco relevantes para as neoplasias de cabeça e pescoço o tabagismo, o consumo de álcool, o estado precário dos dentes, o uso de próteses mal ajustadas, a exposição solar e algumas infecções virais, especialmente o papiloma vírus. (DOBROSSY, 2005; KUMAR *et al.*, 2007). A associação do tabagismo e do etilismo apresenta efeito sinérgico no processo de carcinogênese, principalmente para o câncer de boca e faringe. (BLOT *et al.*,1988; FARDIN *et al.*, 2004;HASHIBE *et al.*, 2009; LUBIN *et al.*, 2011). Rothman e Keller (1972) apresentaram um risco relativo de câncer oral aumentado de acordo com o nível de consumo de álcool e cigarro. Para uma taxa de 40 cigarros ou mais por dia, o risco relativo foi de 8,21 para os que também bebiam 0,4-1,5 onças/dia. Dentre as exposições ocupacionais, Andreotti (2006) ressaltou outros fatores de risco associados ao câncer bucal e orofaringe como: derivados da combustão do petróleo, solventes e partículas de materiais isolantes.

Em um estudo transversal pioneiro, Doll e Hill (1964) demonstraram a relação entre tabagismo e câncer de vias aéreas superiores e trato gastrointestinal. A mortalidade de homens fumantes, com carga tabágica de 25 ou mais cigarros/dia foi

74% maior que os fumantes com taxa de 15 cigarros/dia, elevando-se para 171% na comparação com a população de não tabagistas.

Alguns tipos de cânceres relacionam-se ao baixo nível sócio-econômico, destacando-se dentre eles o de boca (WUNSCH-FILHO, 2002; GUERRA *et al.*, 2005). No intuito de comparar o nível de escolaridade ao tamanho do tumor Noce *et al.* (2008), constataram que indivíduos mais instruídos apresentam tumores orais menores, especificamente o carcinoma espinocelular de boca, devido à procura mais precoce pelo tratamento médico e à melhor percepção de lesões orais. Quanto aos hábitos alimentares, alguns autores destacaram os efeitos benéficos do alto consumo de frutas e vegetais, especialmente os ricos em β -carotenos, na proteção dos cânceres de cabeça e pescoço. (WRIGHT *et al.*, 2007).

Na cavidade oral, a língua é o sítio mais comum das neoplasias, acometendo entre 25 a 30% dos carcinomas deste sítio; o assoalho bucal e o trígono retromolar são também sítios prevalentes (DEDIVITIS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006. Brenner *et al* (2007), em levantamento epidemiológico de 75 manuscritos relacionados ao carcinoma de cavidade oral, observam que a língua era acometida em 32,7% dos casos e o de assoalho bucal em 23,3%. Para Perussi (2002) os sítios intra-orais mais prevalentes do carcinoma de boca são: língua (41.5%), assoalho bucal (30%), gengiva (12,7%), palato (11,8%) e região jugal (3,7%). Na região da orofaringe as tonsilas são acometidas em 76% dos casos (DEDIVITIS *et al.*, 2004). Em estudo que envolveu 36.268 pacientes hospitalizados, St Guily *et al.* (2007) registraram, entre os locais mais acometidos pelas neoplasias malignas de cabeça e pescoço, a orofaringe (n-12.232; 28%) e da cavidade oral (n-10.786; 25%).

Com relação ao carcinoma da faringe, os fatores etiológicos coincidem com os envolvidos no desenvolvimento do carcinoma de cavidade oral. (LAMBERT *et al.*, 2011; LUBIN *et al.*, 2011) O tabaco vem sendo descrito como o principal fator de risco para este sítio. A associação entre o tabagismo e o consumo alcoólico demonstra efeito sinérgico (HASHIBE *et al.*, 2009), fato confirmado também por Lubin *et al.* (2011), especialmente no sexo feminino.

Alguns autores destacam a alta prevalência de infecção pelo HPV nos pacientes com carcinoma de faringe, podendo ser responsável por 26% dos cânceres de cabeça e pescoço, havendo predileção pelas tonsilas e base de língua. O DNA do HPV foi detectado em 30% dos carcinomas de cabeça e pescoço, sendo o subtipo 16 identificado em 86,7% das amostras positivas. (ST GUILY *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2011).

Na exposição ocupacional, o câncer de hipofaringe relaciona-se à exposição ao formaldeído e à poeira de carvão (LAFOREST *et al.*, 2000).

O câncer da laringe corresponde a 25% dos tumores da região de cabeça e pescoço e a 1 e 2% de todos os tumores malignos do organismo (COSTA, 2006; INCA, 2012). É a segunda neoplasia maligna mais comum do trato respiratório, depois do câncer de pulmão. Dados internacionais de câncer de laringe apontam registros populacionais brasileiros na cidade de Campinas (SP) e em Goiânia (GO) em torno de 7,4 casos/100 mil e 6,4 casos/100 mil por ano, respectivamente (coeficiente ajustado por idade pela população mundial) (PARKIN *et al.*, 2002). Em 2008 houve 3.594 óbitos no Brasil por câncer de laringe (3.142 homens / 452 mulheres). As estimativas do INCA apontam 6.110 novos casos de câncer de laringe para 2012 (INCA, 2010).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de laringe não diferem dos sítios anteriores (boca e faringe), destacando-se o tabaco, o consumo de

bebidas alcoólicas e a associação de ambos. Alvarenga (2008), em estudo retrospectivo que envolveu 427 pacientes portadores de neoplasias malignas de cabeça e pescoço constatou predomínio dos indivíduos de cor branca (90%), idade média de 61 anos, gênero masculino (86%), hábito de fumar (83,37%), hábito de ingerir bebidas alcoólicas (65,80%), e associação dos vícios em 55,27% dos casos. A cavidade oral foi o principal sítio anatômico (35,37%), seguido da laringe (31,15%) e da orofaringe (16,15%). Menezes, *et al* (2002) avaliaram os riscos de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuíveis ao fumo, e para essa finalidade analisaram os resultados de três estudos de caso-controle de pacientes hospitalizados, internados por outros motivos, considerados controles. Com relação ao tabagismo os pacientes foram classificados em não-fumantes, ex-fumantes ou fumantes atuais. Foram incluídos 122 portadores de câncer de pulmão (244 controles), 50 de câncer de laringe, 48 de câncer de esôfago e 96 pacientes portadores de outras doenças não neoplásicas. Para ex-fumantes e fumantes com câncer de pulmão, o risco populacional atribuível (RPA) foi de 63% (IC 95%, 0,58-0,68) e 71% (IC95%, 0,65-0,77), respectivamente; para câncer de laringe foi de 74% (IC95%, 0,70-0,78) e 86% (IC95%, 0,81-0,85), respectivamente e para câncer de esôfago foi de 54% (IC95%, 0,46-0,62) para fumantes. Os autores constataram ainda a importante redução nos índices de câncer de pulmão, laringe e esôfago com a cessação do hábito de fumar e confirmam, mais uma vez, a alta relação entre câncer e tabagismo.

Os componentes do cigarro nocivos ao organismo são inúmeros destacando-se: benzeno, amônia, acetona, tolueno, acetaldeído, acroleína, alcatrão, nicotina, monóxido de carbono, fenol, ácido fórmico, ácido acético, chumbo, cádmio, zinco, níquel, hidrocarbonetos policíclicos, aminas aromáticas e nitrosaminas.etc. (FANT, 1998). Vários deles já são comprovadamente carcinogênicos e usados em experimentos com animais como o benzeno, aldeídos voláteis, nitrosamidas voláteis e ácido nitrosamido

(IARC, 2004). Ressalta-se que essas substâncias são nocivas também à aqueles que não fumam (World Health Organization, 2009) os quais foram beneficiados pela lei antifumo (Lei 13.541, 2009) que proíbe o uso de cigarro e derivados de tabaco em ambientes coletivos, tanto públicos quanto privados (SÃO PAULO, 2009).

Outros agentes carcinogênicos para as neoplasias de cabeça e pescoço são descritos na literatura como a exposição à radiação, ao asbesto, aos hidrocarbonetos aromáticos e ao percloroetileno. (CAMPOS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2006) Sartor *et al.* (2007) ressaltam também os efeitos nocivos da inalação da sílica cristalina livre, da fuligem de carvão mineral, de pós de madeira e do óleo combustível como estatisticamente relacionados ao câncer de laringe dentre outros.

Aos fatores acima relacionados, aliam-se a predisposição genética individual. Alguns trabalhos apontam aumento do número de casos de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos jovens, sem a exposição ao tabagismo e etilismo, o que reforça a participação genética no desenvolvimento da neoplasia (VENTURI *et al.*, 2004; LOTHAIRE *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2009).

2. Aspectos histológicos do carcinoma espinocelular da boca, da faringe da laringe.

O carcinoma de células escamosas corresponde a 90 a 95% de todos os carcinomas da cavidade bucal e é denominado de carcinoma epidermóide ou espinocelular. Macroscopicamente a lesão tem aspecto vegetante ou ulcerado, com bordas elevadas e fundo granuloso. O diagnóstico precoce é dificultado pelo fato da lesão ser pouco dolorosa, transmitindo ao portador, a falsa idéia de benignidade (INCA, 2002). No entanto, o exame detalhado realizado por médicos e odontólogos,

associado às medidas preventivas de higiene oral e abolição dos vícios são iniciativas capazes de agilizar o diagnóstico, identificar lesões pré-malignas e prevenir o desenvolvimento do câncer.

O carcinoma das mucosas aéreas e digestivas pode ser precedido pelas lesões pré-neoplásicas, especialmente a leucoplasia, em cuja análise histológica pode-se identificar epitélio com hiperqueratose, acantose, hipertrofia das células distais ou basais e infiltrado inflamatório crônico. (NEVILLE *et al.*, 1995; CAMPOS *et al.*, 2003). O grau de malignização das leucoplasias gira em torno de 5% a 25% e inicia-se a partir das áreas displásicas. A eritroplasia é também considerada lesão pré-neoplásica da cavidade oral e manifesta-se como uma placa avermelhada bem delimitada e assintomática. Histologicamente, o epitélio mostra-se atrófico devido à perda da camada de queratina, permitindo identificação da microvasculatura, o que justifica a coloração avermelhada, típica da lesão. Displasia grave e carcinoma *in situ* são encontrados em 90% dessas lesões (NEVILLE *et al.*, 1995; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007).

Em revisão dos diagnósticos de lesões orais em 205 pacientes, Silveira *et al.* (2009) constataram predomínio da leucoplasia (70,7%), seguida da queilite actínica (16,1%), da eritroplasia (9,8%) e da eritroleucoplasia (3,4%). O grau de malignização foi descrito em 30% das leucoplasias e em 45% das eritroplasias.

Na região da faringe, o carcinoma espinocelular incide em 80% a 90% dos tumores malignos, sendo o restante, de origem hematopoiética (linfoma) ou derivados das glândulas salivares (COSTA *et al.*, 2006). Na orofaringe as tonsilas palatinas são os sítios mais prevalentes do carcinoma, apresentando-se como lesão ulcerada e pouco dolorosa nos estágios iniciais, porém responsável por importante odinofagia e otalgia nas fases mais avançadas. Assimetria das tonsilas e adenopatia cervical são sinais de alerta de malignidade. Em revisão de 50 anos de carcinoma oral, González *et al.* (2004),

constatarem carcinoma epidermoíde em 31,6%, seguido de hiperplasia folicular e parafolicular em 26,3%, linfomas em 10,5% e papilomas em 10,5%. O envolvimento da base da língua, muitas vezes dificulta o diagnóstico precoce pelas dificuldades no auto-exame, motivo pelo qual os pacientes chegam à consulta em estágios mais avançados (CAMPOS *et al.*, 2003).

O câncer da laringe corresponde à sexta neoplasia mais comum no mundo, sendo tipo epidermoíde responsável por mais de 90% dos carcinomas da cabeça e pescoço (KUMAR, 2005). Surge do epitélio de superfície e é caracterizado por ilhas de células epiteliais malignas (NEVILLE, 2002). Toda a extensão da laringe pode ser comprometida pelas células neoplásicas, havendo predileção pela região glótica. Com o comprometimento das pregas vocais surgem sintomas iniciais de rouquidão que não melhoram em semanas, como, naturalmente ocorreria no curso das laringites inflamatórias ou infecciosas. Sintomas adicionais respiratórios ou digestivos são tardios, o que faz com que o paciente demore em procurar o serviço de saúde, protelando o diagnóstico e o tratamento.

Pesquisas experimentais em oncogênese animal vêm sendo realizadas na tentativa de reproduzir o carcinoma da laringe. Duarte *et al.*, (2006) estudaram os efeitos nocivos do tabagismo sobre as pregas vocais de ratos, mantendo os animais expostos à fumaça de cigarro, em corpo inteiro, durante diferentes períodos (25, 50 e 75 dias). Ao final do estudo, os autores realizaram análise histológica das mucosas laríngeas e identificaram metaplasia escamosa em pregas vocais, mesmo nos animais mantidos por menor tempo de exposição.

As displasias são lesões frequentemente diagnosticadas em mucosas de pacientes tabagistas. Banoczy e Csiba (1976) chamam a atenção para os seguintes parâmetros histológicos na identificação das displasias: estratificação epitelial irregular, hiperplasia das células da camada basal, aumento do número de figuras mitóticas, perda da polaridade das células basais, aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear, hipercromatismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, ceratinização de células isoladas ou em grupos na camada celular espinhosa e redução da aderência das junções intercelular. A displasia é considerada uma lesão epitelial pré-cancerosa e é classificada como leves, quando as atipias são identificadas no terço basal da espessura do epitélio; moderadas quando se estendem aos dois terços basais; graves, quando envolvem toda a espessura do epitélio, sendo muitas vezes difícil de serem diferenciadas do carcinoma intra-epitelial ou *in situ* (COTRAN, 1994). As células atípicas representam o resultado final do crescimento descontrolado das células epiteliais, cursando com modificações genéticas, capazes de alterar o controle da atividade proliferativa e reguladora destas células.

No câncer da laringe, as displasias aumentam em grau até o desenvolvimento do carcinoma microinvasor ou “*in situ*”, onde há o comprometimento da membrana basal, porém sem atingir o tecido conjuntivo subjacente ou o músculo vocal, ao contrário do carcinoma invasivo (COSTA, 2006). Deve-se ressaltar que nem todas as lesões displásicas se transformarão em carcinoma; inversamente, nem todas as lesões com ausência de displasia epitelial estão livres de malignização (VAN DER WAAL *et al.*, 1997).

3. Aspectos imunohistoquímicos da proteína p53 e Ki-67 no câncer de boca, faringe e laringe

Estudos imunohistoquímicos vêm ocupando lugar de destaque nas pesquisas que envolvem os tumores, porém a importância das técnicas histológicas convencionais deve ser reconhecida por fornecer dados preciosos para o diagnóstico e nortear os estudos imunohistoquímicos. Estes têm sido utilizados como marcadores tumorais e como indicadores prognósticos, sendo que alguns deles permitem a identificação de proteínas reguladoras do ciclo celular, como a p53 e Ki-67.

O gene *TP53* (gene supressor tumoral) vem sendo exaustivamente estudado por corresponder ao mais comumente gene mutável nos carcinomas espinocelulares. Encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17 (INOUE *et al.*, 2005) e é considerado guardião do genoma por preservar a sequência celular de nucleotídeos ao longo da cadeia de DNA, e ser capaz de detectar possíveis mutações. O gene p53 participa intensamente dos mecanismos de reparação celular e da aceleração do processo de apoptose, nos casos de mutação, prevenindo assim proliferação das células mutantes para outras gerações (FETT-CONTE *et al.*, 2002; HUSSAIN *et al.*, 2006). A proteína p53, considerada selvagem, tem meia vida de minutos, sendo praticamente indetectável. Porém mecanismos ativadores do *TP53* como estresse celular, lesões do DNA, hipóxia, replicação e ativação viral, resultam em mutação do gene e, conseqüentemente, aumento de sua meia vida o que facilita sua detecção (KLUMB *et al.*, 2002). Desta forma, as alterações no gene *TP53* podem ser evidenciadas tanto pelo estudo do sequenciamento do gene por técnicas específicas (PCR- Reação da Cadeia de Polimerase, ELISA, polimorfismo) como pela detecção da proteína através da imunoexpressão da proteína p53, inferindo em mutação do gene *TP53*. Deve-se ressaltar, entretanto que em algumas situações, a proteína p53 pode estar ausente mesmo na

presença de mutação do *TP53*, devido ao processo acelerado de sua degradação, evento este que pode ser causado pela super expressão do gene Mdm-2 (KLUMB *et al.*, 2002; CASTAÑEDA *et al.*, 2007) a qual regula a atividade da p53, bloqueando sua atividade transcricional. A Mdm2 liga-se à p53 e move-a para o citosol para degradação e inibição da atividade. (OPTIZ *et al.*,2001; GASCO;CROK, 2003; LOPES *et al.*,2008).

A sequência de eventos observados após o dano celular e a ação da proteína p 53 nesse processo está ilustrada na figura 1.

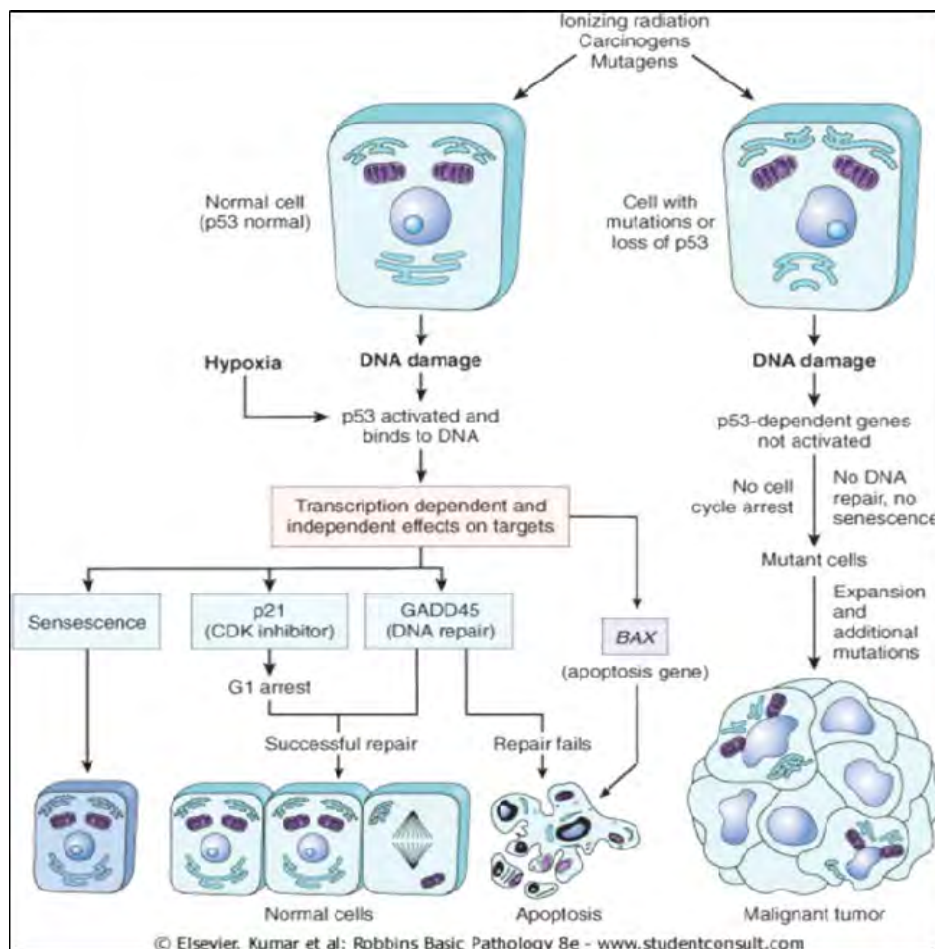


Figura 1. Esquema representativo das diversas ações da p53 sobre a célula danificada. (Fonte: Robbins & Cotran, 8ª edição, 2010)

A importância do TP53 no mecanismo de supressão tumoral pode ser refletida pela taxa elevada de mutação desse gene em carcinomas humanos, presente em aproximadamente 50% dos tumores de cabeça e pescoço (BRENNAN *et al.*, 1995). Segundo Boyle *et al.*(1993), as taxas de mutação do gene P53 variam entre 19% em lesões não-invasivas (carcinoma *in situ* e displasias) a 43% em carcinomas invasivos. Goulart Filho *et al.*, (2006) investigaram a presença de mutação do gene *TP53* em 12 fragmentos de mucosa oral normal, 38 fragmentos de lesões leucoplásicas (16 das quais contendo displasia) e 87 fragmentos de lesões orais de carcinomas de células escamosas. A mutação desse gene foi observada em duas das 16 leucoplasias com displasia epitelial e em 55 dos 87 carcinomas, não sendo observada no epitélio normal ou nas leucoplasias sem displasias. Esses resultados demonstram a especificidade deste imunomarcador na identificação dos carcinomas espinocelulares e de lesões pré-neoplásicas.

Cabanillas *et al.*, (2007) estudaram a expressão da p53 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CEC) e constatarem correlação significativa entre a expressão da p53 na metástase linfonodal e a redução da sobrevida desses pacientes. No *follow up* de cinco anos a sobre vida dos pacientes com expressão negativa para a p53 nos linfonodos cervicais foi de 70% contra 30% nos pacientes com expressão positiva, confirmando a importância desse marcador, não apenas no diagnóstico do carcinoma, mas também no seu prognóstico. Corroborando com esses estudos, Luo *et al.*, (2005) ressaltaram a positividade desse imunomarcador não apenas na célula tumoral, mas também nas células adjacentes ao tumor.

O anticorpo Ki-67 tem sido tema de diversos estudos oncológicos por ser capaz de identificar células em proliferação. Foi primeiramente descrito como anticorpo monoclonal, presente em todas as fases do ciclo celular (G1, S e G), exceto na fase com

ausência na replicação, uma vez que reage com uma estrutura nuclear presente exclusivamente na proliferação celular. (SCHOLZEN *et al.*, 2000).

O Ki-67 possui meia-vida em torno de uma hora (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992) sendo identificado por uma proteína chamada MIB. Esse marcador é largamente utilizado na determinação da função de crescimento de célula neoplásica humana (BROWN *et al.*, 1990) e um poderoso indicador prognóstico (SCHOLZEN *et al.*, 2000).

Piatelli *et al.*, (2002), com a finalidade de verificar a expressão das proteínas p53, Bcl-2 e Ki-67 e o índice de apoptose de células de tumores orais, avaliaram 70 fragmentos de biópsias de boca, sendo 10 de mucosa normal, 12 de lesões leucoplásicas e 36 de carcinoma. Na mucosa normal, a maior expressão das proteínas estudadas foi identificada apenas no núcleo das células da camada basal do epitélio; contudo nas leucoplasias e nas displasias, os anticorpos p53 e Ki 67 foram observados nas camadas basais e parabasal. A imunomarcção da Bcl-2 foi constatada somente na camada basal e ocasionalmente na parabasal nos fragmentos de displasias. Nos carcinomas, a maior expressão de todas as proteínas foi registrada em toda a extensão do epitélio, envolvendo, portanto as células da camada basal, parabasal e apical. Os autores observaram também que os índices mais elevados de apoptose e de proliferação celular mantinham relação direta com a superexpressão da p53.

Gorban *et al.*, (2007) avaliaram as biópsias de 64 pacientes portadores de carcinoma invasivo da laringe, realizando análises imunohistoquímicas com o Ki-67 e P53, com a finalidade de analisar associações entre os níveis desses anticorpos e tamanho, grau de diferenciação e recorrência tumoral. Os autores observaram correlação direta entre Ki-67, tamanho e grau de diferenciação do tumor. Por outro lado a recorrência tumoral associou-se apenas com a imunoexpressão do p53. Desta forma,

ambos os marcadores foram considerados importantes na avaliação do prognóstico de sobrevida do paciente portador de neoplasia. Corroborando com esses achados, Motta *et al.*, (2009), estudaram esses mesmos imunomarcadores na avaliação do estadiamento de 28 casos de carcinoma epidermóide de cavidade oral e língua e constatou positividade nos tumores mais volumosos, demonstrando o valor dessa metodologia no prognóstico dos tumores. O valor do Ki-67 no prognóstico do câncer de laringe e hipofaringe foi também salientado por Liu *et al.*, (2003) em estudo que incluiu 59 pacientes com neoplasias nesses sítios sendo a positividade mais expressiva em pacientes com metástase linfonodais.

A associação entre esses dois marcadores p53 e o Ki-67 foi descrita como um fator preditivo de melhor controle locoregional do tumor de orofaringe. Grabenbauer *et al.*, (2000) salientaram a relação entre a baixa proliferação celular demonstrada pela expressão do Ki-67, menor ou igual a 20%, e a forte positividade da expressão nuclear do p53, considerada excelente marcador de controle locoregional de tumor.

Diversos modelos de carcinogênese experimental têm sido descritos na literatura. A utilização do agente alquilante 4- nitroquinolina 1-óxido (4NQO) é um deles e tem sido eficaz na reprodução de câncer em cavidade oral e trato aerodigestivo de animais (DAYAN *et al.*, 1997; MINICUCCI, 2008). Outras metodologias utilizam a inalação de fumaça de cigarro nos estudos de carcinogênese e para esta finalidade os animais são expostos ao agente agressor por diferentes períodos e vias. Na exposição do tipo corpo inteiro os animais são confinados em câmaras e forçados a inalar a fumaça que é introduzida por períodos programados. Essa metodologia é amplamente utilizada por diversos autores os quais têm conseguido reproduzir lesões em vias aéreas secundárias à inalação de fumaça de cigarro. Lam (1980), utilizando esse modelo experimental de carcinogênese, demonstrou, em ratos, perda do epitélio de transição da

laringe, áreas de necrose focais e processo inflamatório mesmo após apenas uma hora de exposição à inalação do tabaco. Walker *et al.* (1978) expuseram ratos à inalação de fumaça de cigarro por 47 dias, duas vezes ao dia e verificaram espessamento epitelial na laringe, aumento da camada de queratina e processo inflamatório linfocitário. Em exposição à inalação de fumaça de cigarro durante apenas 14 semanas, Bolton *et al.*, (2009) evidenciaram metaplasia escamosa em vias aéreas de ratos.

Mais recentemente, preocupados em tornar o modelo experimental mais semelhante ao hábito de fumar, alguns autores têm desenhado câmaras de exposição à fumaça de cigarro nas quais apenas o focinho do animal entra em contato com o agente agressor, garantindo assim, as análises também dos efeitos térmico da fumaça de cigarro e a manutenção constante da quantidade dos componentes do cigarro (JARDIM *et al* , 2010).

O tempo de exposição aos agentes agressores também varia entre autores. Carter e Misra (2010) salientam que a fisiopatologia os eventos da carcinogênese inicia-se com o processo inflamatório, o qual pode ser observado com poucos dias de experimentação. Na metodologia utilizada por esses autores 90 animais foram expostos por cinco dias à fumaça de cigarro, três horas por dia, cinco vezes na semana através de câmaras com exposição apenas nasal. Esse curto período de experimentação foi suficiente para determinar alterações inflamatórias importantes no pulmão como aumento do número de macrófagos alveolares e proteínas inflamatórias.

Pela revisão de literatura apresentada acima se percebe a preocupação dos diversos autores em demonstrar os efeitos nocivos do tabaco sobre as vias aéreas e a diversidade dos métodos utilizados para essa finalidade nos experimentos com modelos animais. Em pesquisa anterior, realizada pelo nosso grupo, foram demonstrados os

efeitos nocivos da exposição crônica ao tabagismo e ao etilismo sobre a mucosa oral e faringiana de ratos, sendo diagnosticadas lesões displásicas de diversos graus e até mesmo carcinoma *in situ* nos sítios estudados. O tempo de experimentação desse estudo foi de 260 dias e a inalação de fumaça de cigarro ocorreu apenas uma vez ao dia, utilizando-se carga tabágica de 10 cigarros/dia. Embora nessa pesquisa tenham sido registradas lesões importantes nas vias aéreas, nota-se que o tipo de exposição à fumaça de cigarro diferiu, em parte, daquela que corre no dia a dia do indivíduo fumante, sendo mais vezes durante o dia. Sendo assim, no presente estudo procurou-se reproduzir de forma mais fidedigna a situação vivenciada pelo indivíduo fumante passivo, ampliando-se os momentos de exposição à fumaça de cigarro. O tempo do experimento foi também encurtado para análise dos eventos iniciais da carcinogênese nas fases de promoção.

2. Objetivos

Estudar, em ratos, os efeitos da exposição aguda à fumaça de cigarro sobre as mucosas da língua, faringe e laringe, por meio de análises histológicas e imunohistoquímicas da expressão das proteínas p 53 e Ki-67.

3. Material e Métodos

3.1 Animais utilizados

O projeto de pesquisa foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP sob protocolo de número 698/2008-B. Em seguida teve início com a seleção de 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 200-250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

3.2 Ambiente de experimentação

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



Figura 2. Metodologia de oferta de líquidos e de ração aos animais do experimento.

3.3 Grupos Experimentais

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

Grupo I - Controle: 20 ratos que receberam ração e água “*ad libitum*” por um período de 60 dias.

Grupo II - Tabaco: 20 ratos expostos à inalação de fumaça de 40 cigarros/ dia, durante sete dias por semana, ração e água “*ad libitum*”, por um período de 60 dias.

Para melhor diferenciação dos grupos, esses foram denominados em **GC** grupo controle e **GT** grupo tabaco.

3.4 Sequências das etapas experimentais

3.4.1 Exposição à fumaça do cigarro

Os animais do grupo tabaco foram submetidos, por um período de 60 dias, à exposição diária à fumaça do cigarro em incubadora modificada, através do método padronizado por outros autores (SIMANI *et al.*,1974; WANG *et al.*,1999) e adaptado ao laboratório experimental desta instituição por Paiva *et al.*(2003), conforme descrição a seguir. Os ratos foram colocados em câmara transparente, com um volume de aproximadamente 95 x 80 x 65 cm, conectada ao “aparelho de fumar” (figuras 3a, 3b e 4). *Puffs* de fumaça foram aspirados dos cigarros por vácuo, utilizando-se o “aparelho de fumar”, e depois direcionados para a câmara, durante um período de 30 minutos, durante quatro vezes ao dia, completando uma exposição de 40 cigarros ao dia (figura 4). O cigarro utilizado foi de marca comercial com a seguinte composição: 1 mg de nicotina, 1 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono. O método de exposição dos animais foi de corpo inteiro.

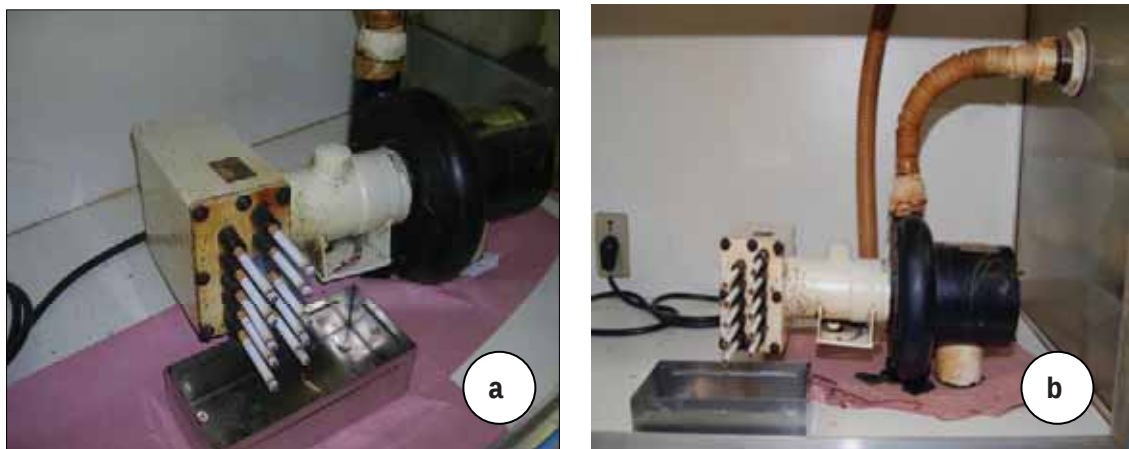


Figura 3. Aparelho de fumar: em a, detalhes do local de adaptação dos cigarros; em b, detalhes da conexão do aparelho de fumar à câmara onde estão os animais expostos à fumaça.



Figura 4. Detalhes da metodologia da experimentação para exposição dos animais à inalação da fumaça de cigarro. Do lado esquerdo da figura está posicionada a máquina de fumar e do lado direito a câmara com os animais.

3.4.2 Procedimento da eutanásia e realização das biópsias

Após os 60 dias de experimentação, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg) por via intramuscular. Após anestesia foi realizada tricotomia cérvico-torácica e abdominal e anti-sepsia com álcool 70%. Posteriormente foi realizada cérvico-esternotomia mediana, estendida superiormente até a região mandibular. Com auxílio de tesoura de Mayo, o arco mandibular ósseo foi exposto e fraturado bilateralmente na região parasinfisária, para facilitação da remoção do segmento aereodigestivo que abrangeu língua, faringe, laringe e primeiros anéis traqueais (figura 5), realizada delicadamente por meio de pinças de prensão e tesouras oftalmológicas delicadas, evitando-se manipulação das superfícies a serem estudadas. O segmento removido da via aérea foi examinado macroscopicamente de forma cautelosa para identificação de

possíveis áreas de lesões a serem biopsiadas. Na ausência destas, foram padronizadas biópsias em três sítios: porção posterior da língua (1x1 cm; L), imediatamente à frente do “V” lingual, face lateral da hipofaringe (0,5x0,5 cm; F) e na laringe (La), ao nível das pregas vocais (figuras 5 e 6).



Figura 5. Técnica de dissecação mediana e ressecção da mandíbula dos animais para remoção em bloco do segmento da língua, faringe, laringe e traqueia cervical.

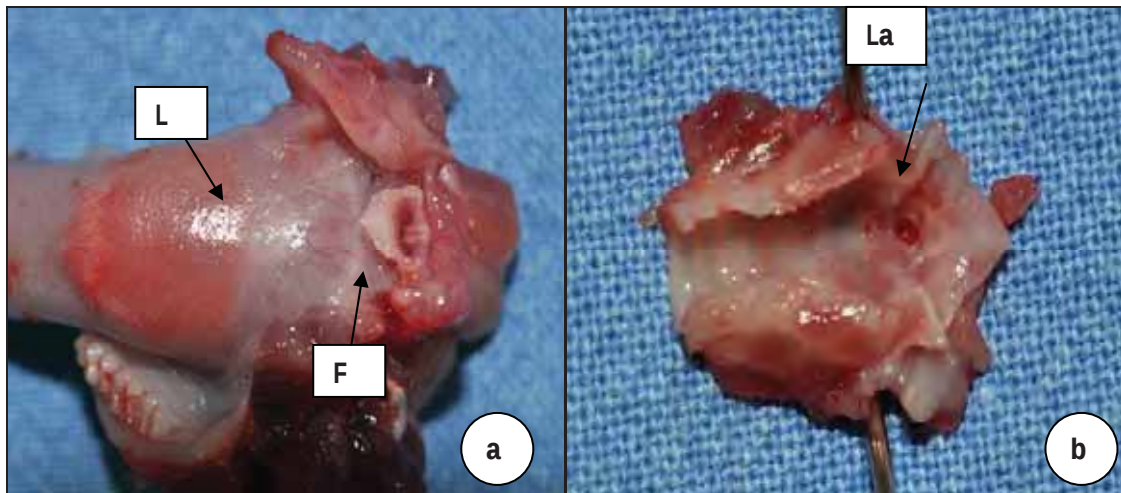


Figura 6. Peça identificada com os pontos das biópsias (a). Segmento em bloco da laringe em detalhe (b).

3.4.3 Preparo das lâminas histológicas e exame de microscopia de luz.

As peças removidas de cada sítio foram imediatamente mergulhadas em formol tamponado a 10%, por 48 horas para fixação. Após esse período foram lavadas em água corrente por 15 minutos, submersas em álcool 70% e enviadas ao Departamento de Patologia Veterinária (FMV- Botucatu – Unesp) para serem processadas.

Para o preparo das lâminas histológicas, os fragmentos de biópsia foram removidos da solução de álcool 70%, incluídos em parafina e cortados por métodos convencionais. Após a montagem, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina & Eosina e examinadas pelo pesquisador e por patologista experiente, por meio de microscópio de luz (marca Zeis – Carl Zeiss do Brasil Ltda), com objetivas de 20 e 40, sem conhecimento prévio dos grupos aos quais pertenciam.



Figura 7. Microscópio de Luz utilizado para as análises histológicas (Carl Zeiss do Brasil Ltda).

Os parâmetros histológicos analisados foram: hiperplasia de células epiteliais basais, hiperkeratose, displasias, congestão de vasos e infiltrado inflamatório de polimorfonucleares neutrófilos na lâmina própria. Os parâmetros estudados, exceto as displasias, foram quantificados pelo seguinte escore semiquantitativo: 0 – sem alteração, 1 – alteração discreta, 2 – alteração moderada e 3 – alteração intensa. As displasias foram classificadas como leve (presença de células atípicas apenas no terço inferior do epitélio), moderada (estendendo-se aos dois terços subsequentes do epitélio) e grave (estendendo-se em toda a altura do epitélio).

3.4.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi utilizada para quantificar a altura da camada de queratina. Para essa finalidade, as lâminas previamente coradas em H&E foram posicionadas no microscópio modelo Axiophot 2 (marca ZEISS, Alemanha, figura 8 a), acoplado a uma câmera digital (modelo AXIO Cam HRc, Alemanha, figura 8 b) e a um microcomputador. As imagens foram digitalizadas utilizando-se o *software* Axion

Vision versão 4,8. Para cada região analisada de um mesmo animal (língua, faringe, laringe), três campos não coincidentes foram fotografados, utilizando-se sempre o mesmo aumento de 40X. Todas as imagens foram obtidas com objetiva de 20. Depois de capturadas, essas foram arquivadas em um banco de imagens e analisadas, posteriormente, no programa Imagem J versão 4,5 (1,43u/Java 16.0). Para cada imagem digitalizada, foram realizadas 10 medidas do parâmetro estudado (altura da camada de queratina). Desta forma, o número total de imagens para cada animal totalizou 90 medidas (30 em língua, 30 em faringe e 30 em laringe).

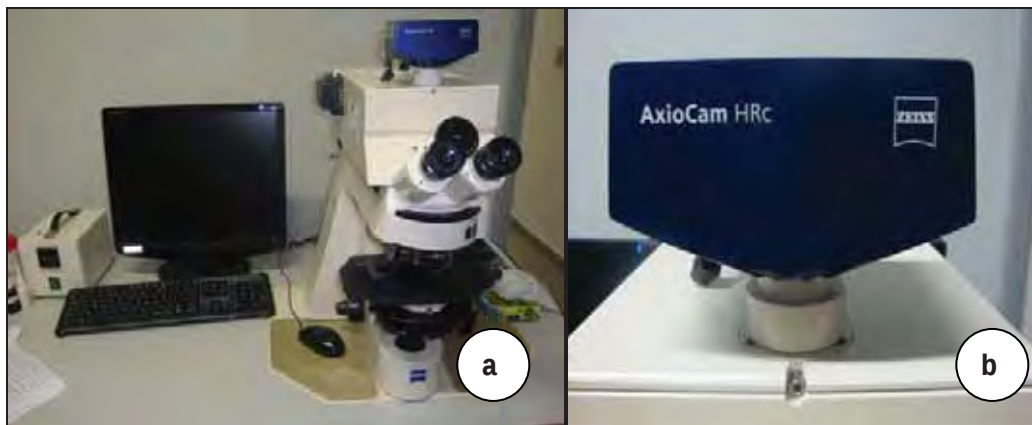


Figura 8. Microscópio utilizado para a digitalização das imagens (a). Em b, detalhe da câmera fotográfica.

3.4.5 Estudo imunohistoquímico

Para o estudo imunohistoquímico os blocos incluídos em parafina foram submetidos a novos cortes com espessura de três micras, estendidos em lâminas de vidro silanizadas (Amitel, Brasil), incubados em estufa a 37⁰ C por 2 horas, para completa adesão à superfície da lâmina. Após esse procedimento, foram transferidos para dispositivos especiais (cassetes), desparafinados por meio de três banhos de xilol e incubados por 5 min. cada banho, em temperatura ambiente. Posteriormente foram

incubados em quatro banhos de etanol absoluto para hidratação. O excesso de líquido foi eliminado por lavagem em água corrente por três min e submetidos às reações imunohistoquímicas, utilizando-se os anticorpos primários anti Ki-67 e p53.

A reação de imunohistoquímica foi realizada com auxílio de um sistema baseado em polímero (NovoLink, Novocastra, Newcastle, Inglaterra), com anticorpos anti Ki-67, p53 sob diluição de 1:50 com diluente próprio (IHC Diluent Solution, Novocastra, Newcastle, Inglaterra) em tampão específico para o anticorpo primário. Após a desparafinização, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas com solução de peróxido de hidrogênio 3%, diluída em água destilada por 10 minutos, em temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, foi realizada a reativação antigênica pelo calor, utilizando-se câmara microprocessada de pressão (Pascal; Dako, Carpinteria; EUA) e tampão Citrato pH 6.0/0,01mM por 15 min. Este procedimento foi realizado com a finalidade de recuperar sítios antigênicos mascarados pela fixação em formol e pela inclusão em parafina. As amostras foram resfriadas por 10 min., em temperatura ambiente. O excesso de líquido foi retirado e os cortes receberam os anticorpos primários diluídos previamente, os quais foram incubados por 18 h, em câmara úmida a 8°C. Os anticorpos foram retirados utilizando-se método de aspiração negativa e as lâminas foram lavadas em dois banhos de tampão Tris-EDTA pH 7.4, em temperatura ambiente, por 5 min. cada banho. Por fim, os cortes foram recobertos pelo bloqueio pós-primário por 30 minutos, seguido de aplicação do polímero por mais 30 minutos, ambos em temperatura ambiente. Foram novamente lavados em dois banhos de Tris-EDTA em pH 7.4, por 5 min. cada banho. A reação foi revelada pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina, as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer. Os cortes foram desidratados por quatro banhos de álcool etílico PA, em concentrações crescentes

de 60%, 65%, 95% e absoluto (100%), e diafanizados por três banhos de Xilol (Chan,2000). As lâminas foram montadas com meio específico (PermOUNT, Fisher Scientific, EUA) e cobertas por lamínulas (KNITTEL), sendo lidas em microscópio.

► Padrões de leitura da imunexpressão do p53 e Ki-67

A leitura da imunexpressão dos anticorpos p53 e Ki 67 foi realizada baseando-se na pigmentação acastanhada dos núcleos das células. Para a quantificação dos resultados, dois escores semiquantitativos foram utilizados: escore de avaliação da extensão do epitélio e escore da avaliação da extensão do corte histológico. Na análise da extensão do epitélio, foram considerados os seguintes parâmetros de imunexpressão: ausência de coloração (0), coloração apenas dos núcleos das células da camada basal (+); coloração dos núcleos das células das camadas basal e parabasal (++); coloração dos núcleos das células de toda a extensão do epitélio (+++). A camada basal é definida como sendo a camada de células epiteliais intimamente relacionadas à membrana basal; camada parabasal corresponde às duas camadas de células acima das células basais; e a extensão total do epitélio às células basais, parabasais e apicais.

Na análise da extensão do corte histológico a imunexpressão foi considerada negativa na ausência de núcleos corados e positiva na presença deles. A imunexpressão positiva foi classificada como: + (quando menos de 10% da extensão do corte com células coradas), ++ (quando 11 a 49% da extensão do corte das células coradas) e +++ (quando a imunexpressão se estendia a mais de 50% da extensão do corte). Esses escores foram adaptados para a pesquisa e seguido o critério descrito no estudo de Ponticello et al.(2000).

As lâminas foram examinadas em conjunto por dois patologistas experientes em técnicas imunoistoquímicas, respeitando-se sempre a concordância de ambos nos registros das pontuações dos escores.

Para validação do controle positivo do anticorpo p53, três ratos com as mesmas características dos demais animais utilizados no experimento, receberam inoculação intra-peritoneal de Dietilnitrozamida na dose de 200mg/kg, substância altamente cancerígena utilizada como modelo de carcinogênese animal segundo estudo de Lennartsson *et al.* (1999). Após 24 horas os animais foram anestesiados, eutanasiados e submetidos à necropsia. Fragmentos teciduais do fígado foram coletados, fixados em formalina a 10% tamponada, rotineiramente processada e incluída em parafina. Cortes histológicos foram obtidos (3 μ m) e submetidos à reação imunohistoquímica utilizando o anticorpo primário anti p53, revelando marcação nuclear positiva nos hepatócitos periportais. Subsequentemente foram utilizados como controles positivos para a reação imunohistoquímica. Como controle positivo para Ki-67 foi utilizado carcinoma mamário de ratas. O controle negativo para ambos os marcadores foi realizado substituindo-se o anticorpo primário por tampão salina fosfato.

3.4.6 Metodologia estatística

Os dados obtidos foram registrados em planilha Excel e os resultados apresentados em forma de tabelas e gráficos.

Quanto à análise dos dados histológicos e imunohistoquímicos foi utilizado o teste do qui-quadrado e quanto à análise dos dados histomorfométricos foi realizado o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

O programa computacional utilizado foi o SigmaStat versão 3.5.

4. Resultados

Durante o período do experimento nenhum animal apresentou intercorrência ou óbito. Após a eutanásia, os fragmentos da língua, faringe e laringe de cada animal foram analisados macroscopicamente e não foram identificadas áreas sugestivas de malignidade.

4.1. Estudo de microscopia de Luz

4.1.1 Superfície da língua

Os escores das análises histopatológicas dos fragmentos da língua dos animais de ambos os grupos estão apresentados na tabela 1. Nos animais do grupo controle foram identificadas apenas algumas alterações benignas como hiperplasia epitelial (n-10%) e hiperplasia de células basais (n-5%). Em nenhum animal de GC foi registrada displasia.

Quando examinada pela microscopia de luz, a superfície da língua dos animais do grupo controle apresentou-se totalmente recoberta por papilas filiformes com aspecto alongado, pontiagudo e cônico, formato este responsável pela sua denominação. Cada papila estava recoberta por uma delicada camada de queratina (figura 9). As células da camada basal estavam justapostas e alinhadas perpendicularmente à membrana basal. As células adjacentes às basais apresentavam-se mais achatadas e com citoplasma mais volumoso, no interior do qual foram identificados inúmeros grânulos hipercromados. O epitélio da língua repousava sobre uma delgada membrana basal, a qual juntamente com a estreita faixa de lâmina própria acompanhava as invaginações das células basais. Os componentes da lâmina própria se restringiam a uma delgada faixa de fibras colágenas, permeadas por alguns vasos sanguíneos, fibroblastos e raros leucócitos. Epitélio, membrana basal e lâmina própria forneciam a cobertura para uma extensa faixa de

tecido muscular que compunha o corpo da língua, correspondendo à sua musculatura intrínseca.

Pela análise de microscopia de luz da superfície da língua dos animais do grupo GT (Tabaco), algumas alterações epiteliais mais relevantes foram identificadas e determinaram diferença estatística entre os grupos ($p < 0,005$), como hiperplasia de células da camada basal (n-95%; figura 10), e displasia epitelial de grau leve a moderado (n-85%; figura 11) e hiperplasia epitelial (n-90%). Em nenhum animal foi identificada na superfície da língua displasia grave ou carcinoma *in situ*.

Tabela 1. Resultado das análises histológicas da superfície da língua em ambos os grupos.

LINGUA	Grupo Controle (GC)					Grupo Tabaco (GT)					Valor de P
	Escore					Escore					
Parâmetros	0	1	2	3	N (%)*	0	1	2	3	N (%)*	p
Hiperplasia cels basais	19	1	0	0	1(5,0)	1	16	3	0	19(95,0)	P<0,0001
Hiperkeratose	0	10	10	0	20(100,0)	0	12	8	0	20(100,0)	P=1,00
Displasia	20	0	0	0	0(0,0)	3	12	5	0	17(85,0)	P<0,0001
Hiperplasia	18	2	0	0	2(10,0)	2	16	2	0	18(90,0)	P<0,0001
Congestão	16	2	2	0	4(20,0)	19	0	1	0	1(5,0)	P=0,15
Carcinoma	20	0	0	0	0(0,0)	20	0	0	0	0(0,0)	P=1,00
PMN	20	0	0	0	0(0,0)	20	0	0	0	0(0,0)	P=1,00

* Número de lâminas alteradas e as respectivas porcentagens dentro de cada grupo de estudo.

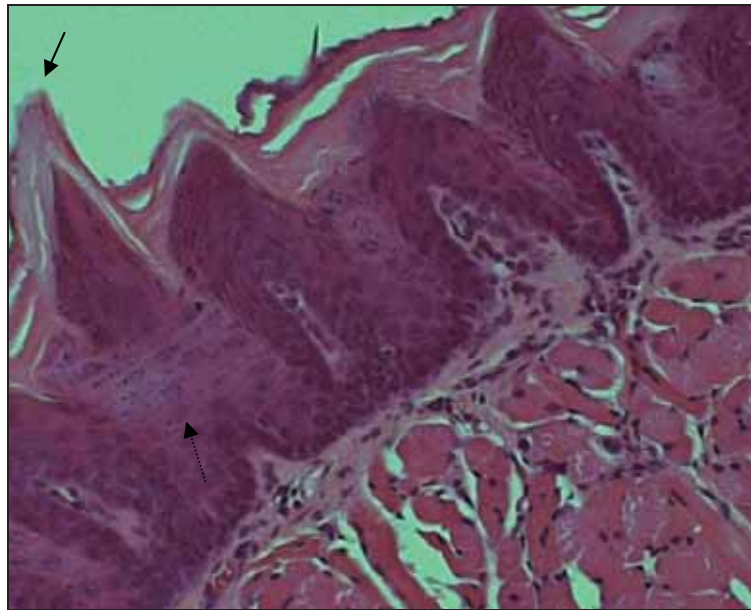


Figura 9. Superfície de língua de animal do grupo controle (GC). Detalhe da camada de queratina sobre as papilas filiformes (seta) e da estreita faixa de lâmina própria. Grânulos intracitoplasmáticos hipercromados nas células distais (seta pontilhada). Microscopia de luz, H&E (40X).

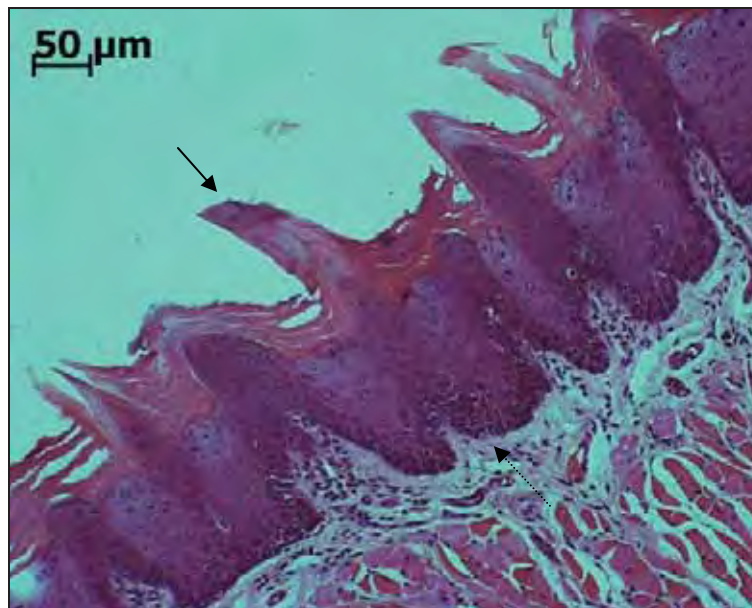


Figura 10 - Superfície dorsal da língua de animal do grupo Tabaco (GT). Detalhes da camada de queratina sobre as papilas (seta contínua). Células basais em intensa proliferação e displasia leve (seta pontilhada), membrana basal e estreita faixa de lâmina própria. Microscopia de Luz, H&E (40 X).



Figura 11 – Superfície dorsal de animal do grupo tabaco (GT). Camada de queratina mais desenvolvida sobre as papilas filiformes (seta contínua), vasos dilatados na lâmina própria (seta pontilhada) e área de displasia focal de grau leve (seta espessa). Microscopia de luz, H&E (40X).

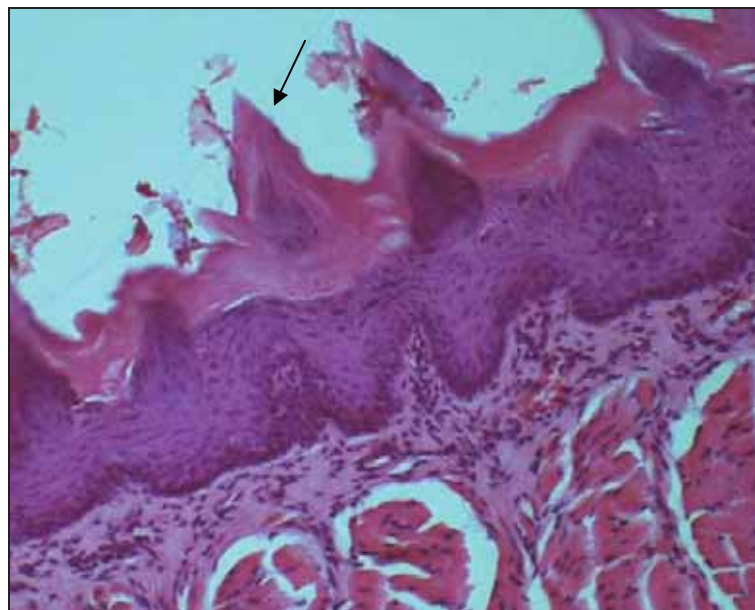


Figura 12 – Superfície dorsal de animal do grupo Tabaco (GT). Detalhes da camada de queratina (seta contínua). Microscopia de luz, H&E (40X).

4.1.2 Superfície da faringe

Os escores das análises histopatológicas dos fragmentos da faringe estão apresentados na tabela 2. Algumas alterações histológicas foram identificadas em ambos os grupos de estudo, porém mais relevantes no grupo tabaco (GT). Entre elas destacaram-se a hiperplasia de células da camada basal (GC-10%; GT-85%), as displasias (GC-0%; GT-25%) e a congestão vascular (GC-70%; GT-95%).

Pela análise de microscopia de luz, a superfície da faringe dos animais do grupo controle (GC) mostrou-se recoberta por epitélio do tipo pavimentoso estratificado queratinizado. As células epiteliais, em número de 5 a 10, apresentavam-se com aspecto mais achatado conforme se aproximavam da superfície distal, estando as células basais dispostas perpendicularmente à membrana basal. A camada de queratina apresentava espessura variável. As células basais repousavam sobre uma delicada membrana basal, cujo trajeto irregular acompanhava as ondulações do epitélio. Na lâmina própria era possível identificar fibras colágenas permeadas por fibroblastos, alguns leucócitos e poucos vasos sanguíneos. Logo abaixo da lâmina própria identificava-se feixe muscular com fibras em diferentes sentidos. Ácinos glandulares foram identificados na lâmina própria, correspondendo às glândulas mucosecretoras da região (figura 13).

Algumas alterações histológicas mais relevantes foram observadas no grupo Tabaco (GT) e estão ilustradas na figura 14 como hiperplasia de células da camada basal, congestão e displasias, sendo estas identificadas em cinco fragmentos de biópsia da faringe.

Tabela 2. Resultado das análises histológicas da superfície da faringe em ambos os grupos.

Faringe	Grupo Controle (GC)					Grupo Tabaco (GT)					Valor de p
	Escore					Escore					
Parâmetro	0	1	2	3	N (%)*	0	1	2	3	N (%)*	p
Hiperplasia cels basais	18	2	0	0	2(10,0)	3	15	2	0	17(85,0)	p<0,0001
Hiperkeratose	2	17	1	0	18(90,0)	0	11	9	0	20(100,0)	P=0,15
Displasia	20	0	0	0	0(0,0)	15	4	1	0	5(25,0)	P= 0,017
Hiperplasia	18	2	0	0	2(10,0)	5	15	0	0	15(75,0)	p<0,0001
Congestão	6	9	5	0	14(70,0)	1	14	5	0	19(95,0)	P= 0,037
Carcinoma	20	0	0	0	0(0,0)	20	0	0	0	0(0,0)	P=1,00
PMN	20	0	0	0	0(0,0)	20	0	0	0	0(0,0)	P=1,00

* Número de lâminas alteradas e as respectivas porcentagens dentro de cada grupo de estudo.

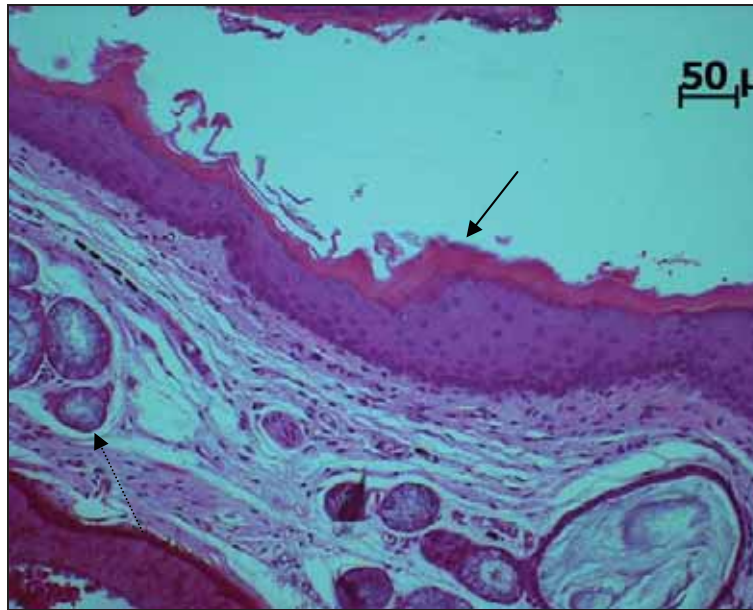


Figura 13. Epitélio de cobertura da região da faringe de animais do grupo controle (GC). Destaque para a espessa camada de queratina sobre o epitélio (seta contínua) e para as glândulas seromucosas mergulhadas na lâmina própria (seta pontilhada). Microscopia de Luz, H&E (40 X).

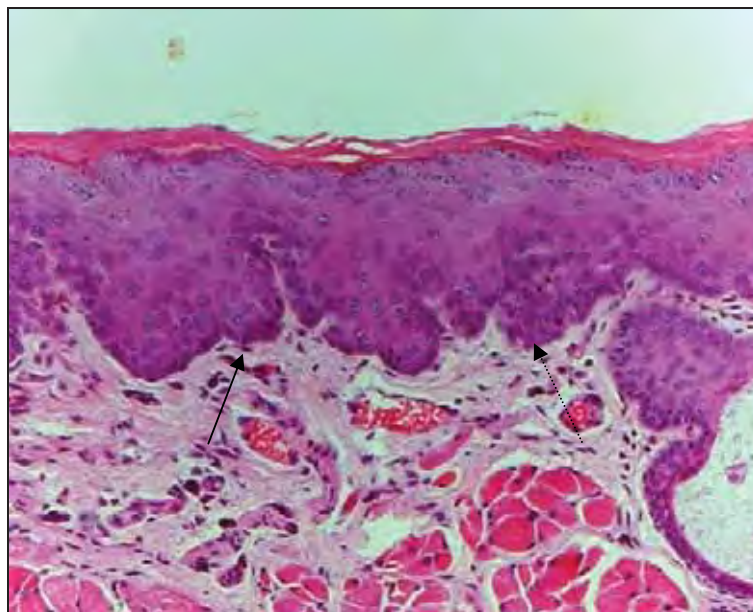


Figura 14. Epitélio de cobertura da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Destaque para a hiperplasia de células basais (seta contínua), congestão vascular e áreas focais de displasia (seta descontínua). Microscopia de luz, H&E (40X).

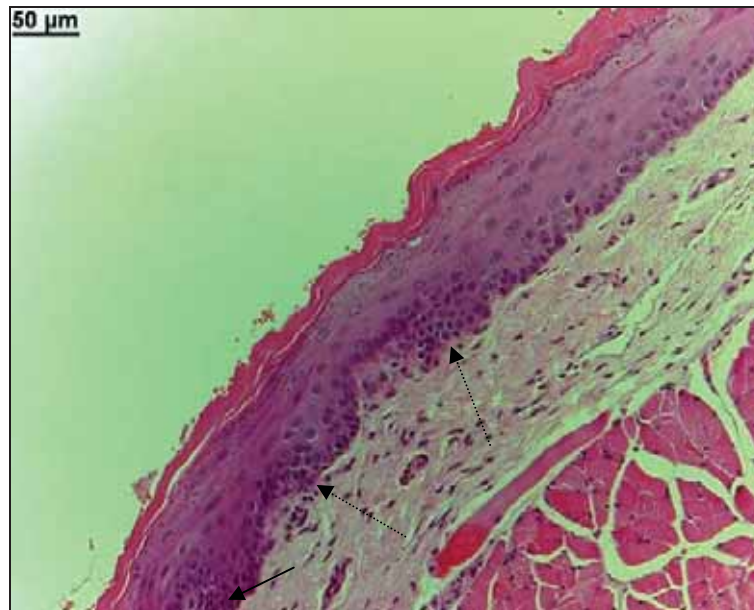


Figura 15. Superfície de faringe de animal do grupo Tabaco (GT). Áreas com hiperplasia de células basais (seta contínua) e displasia focal de grau leve (setas pontilhadas). Microscopia de luz, H&E (40X).

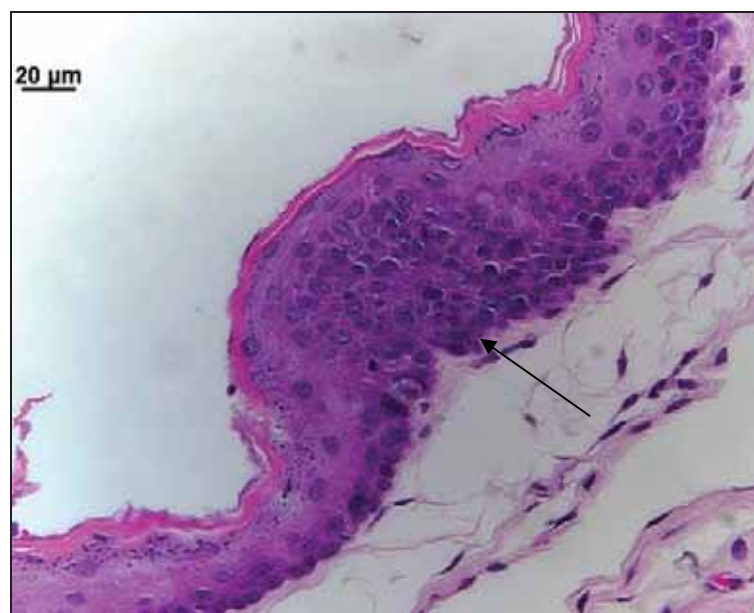


Figura 16. Epitélio de cobertura da faringe de animais do grupo Tabaco (GT). Observa-se área focal de displasia moderada (seta). Microscopia de luz, H&E (80X).

4.1.3 Superfície da laringe

O resultado das análises histopatológicas dos fragmentos da laringe está apresentado na tabela 3. Na comparação entre os grupos, observa-se que os parâmetros que determinaram diferença estatística nesse sítio foram hiperplasia das células da camada basal (GC-10%; GT-70%), hiperplasia epitelial (GC-0%; GC-55%), congestão (GC-80%; GT-100%) e o infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares neutrófilos (GC-0%; GT-25%). Neste sítio também não foi identificado carcinoma em nenhuma lâmina.

Nos animais do grupo controle, o epitélio de cobertura da laringe, ao nível das pregas vocais, era do tipo pavimentoso pluriestratificado, composto por 5 a 10 camadas de células planas justapostas, recobertas por estreita camada de queratina. Conforme se aproximavam da porção mais distal essas células tornavam-se mais achatadas no sentido transversal. A lâmina própria apresentou-se bem mais desenvolvida que nos fragmentos de língua e da faringe, anteriormente analisados, sendo composta por uma larga faixa de tecido conjuntivo, mais frouxo nas porções proximais ao epitélio e mais denso nas mais distais, próximas ao músculo vocal. Pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E) observou-se vasta rede de tecido conjuntivo, não sendo possível a diferenciação entre as fibras elásticas e colágenas por essa técnica citoquímica. Identificou-se ainda vários fibroblastos mergulhados na lâmina própria, alguns vasos sanguíneos e raros leucócitos (figura 17).

Nas análises histológicas dos fragmentos da laringe dos animais do grupo Tabaco (GT) destacou-se a hiperplasia epitelial e o processo inflamatório, representado pela congestão vascular e pelo infiltrado de células inflamatórias, mais prevalentes nesse grupo de estudo (figuras 18 e 19). Em apenas duas lâminas da laringe do grupo Tabaco foram identificadas displasias de grau leve (figura 20).

Tabela 3. Resultado das análises histológicas da superfície da laringe em ambos os grupos.

Laringe	GC-Controle					GT-Tabaco					
Parâmetro	Escore					Escore					
	0	1	2	3	N (%)*	0	1	2	3	N (%)*	P
Hiperplasia cels basais	18	2	0	0	2(10,0)	6	14	0	0	14(70,0)	p<0,0001
Hiperceratose	0	20	0	0	20(100,0)	0	11	9	0	20(100,0)	P=1,00
Displasia	20	0	0	0	0(0,0)	18	0	2	0	2(10,0)	P= 0,15
Hiperplasia	20	0	0	0	0(0,0)	9	11	0	0	11(55,0)	P=0,001
Congestão	4	13	3	0	16(80,0)	0	14	6	0	20(100,0)	P=0,035
Carcinoma	20	0	0	0	0(0,0)	20	0	0	0	0(0,0)	P=1,00
PMN	20	0	0	0	0(0,0)	15	5	0	0	5(25,0)	P=0,017

* Número de lâminas alteradas e as respectivas porcentagens dentro de cada grupo de estudo.

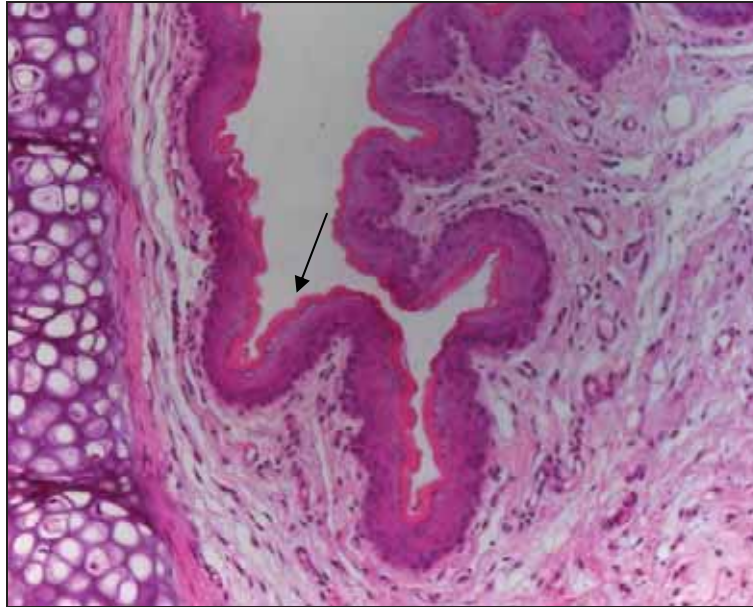


Figura 17. Corte histológico de fragmento de laringe de animais do grupo controle (GC). Observa-se epitélio pavimentoso estratificado da laringe recoberto por estreita camada de queratina em toda a sua extensão (seta contínua) e lâmina própria rica em tecido conjuntivo. Microscopia de Luz, H&E (40X).

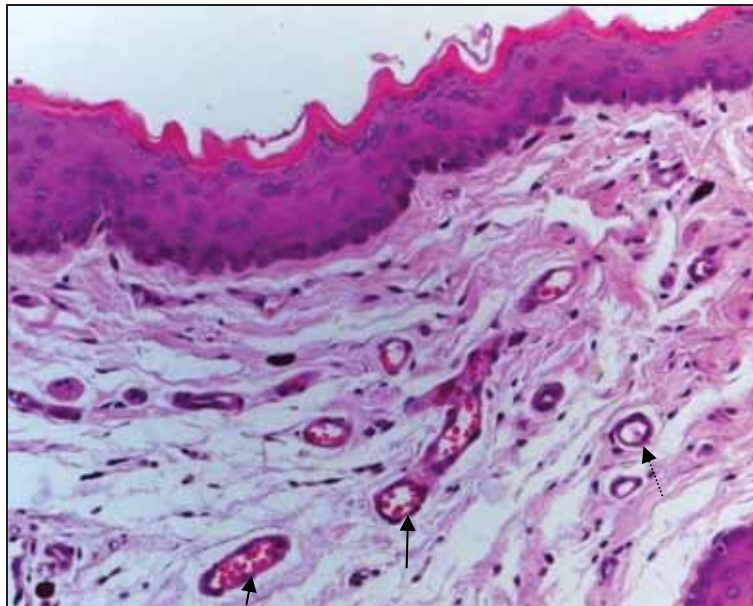


Figura 18. Corte histológico da laringe de animais de GT (Tabaco), sendo observada congestão vascular mais intensa (setas) e infiltrado de células inflamatórias (seta descontinua). Microscopia de Luz, H&E (40 X).

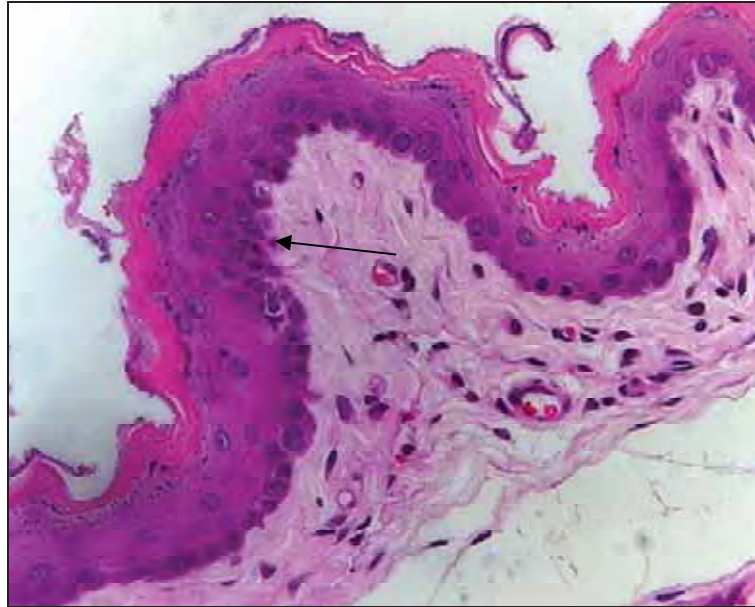


Figura 19. Corte histológico da laringe de animais de grupo Tabaco (GT), sendo observada proliferação de células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, H&E (80 X).

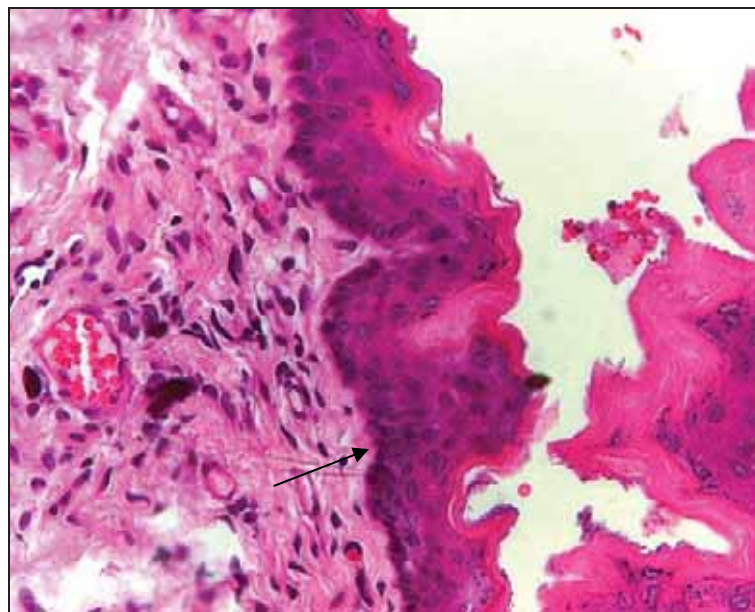


Figura 20- Epitélio da laringe de animais do grupo Tabaco (GT). Destaque para área de displasia focal de grau leve (seta). Microscopia de Luz, H&E (80 X).

4.2 Estudo morfométrico

O estudo morfométrico foi realizado para medir a altura da camada de queratina. Os resultados dessas medidas estão apresentados na tabela 4 e na figura 21. Nos fragmentos de língua, faringe e laringe de GC e GT, as médias e desvios padrão da altura da camada de queratina foram respectivamente: língua - 54,2 μ m e 64,4 μ m; faringe - 16 μ m e 20,6 μ m; laringe - 16 μ m e 21,8 μ m.

Tabela 4. Análise morfométrica da altura da camada de queratina em ambos os grupos. Média e desvio-padrão referentes às variáveis segundo grupo.

Grupos	GC-Controle	GT-Tabaco	
	Média e Desvio padrão	Média Desvio padrão	Valor de p
Queratina- Língua	54,2 $\pm$ 12,3	64,4 $\pm$ 90,1	p=0,019
Queratina Faringe	16 $\pm$ 3,9	20,6 $\pm$ 5,4	p=0,004
Queratina Laringe	16 $\pm$ 3,9	21,8 $\pm$ 8,3	p=0,008

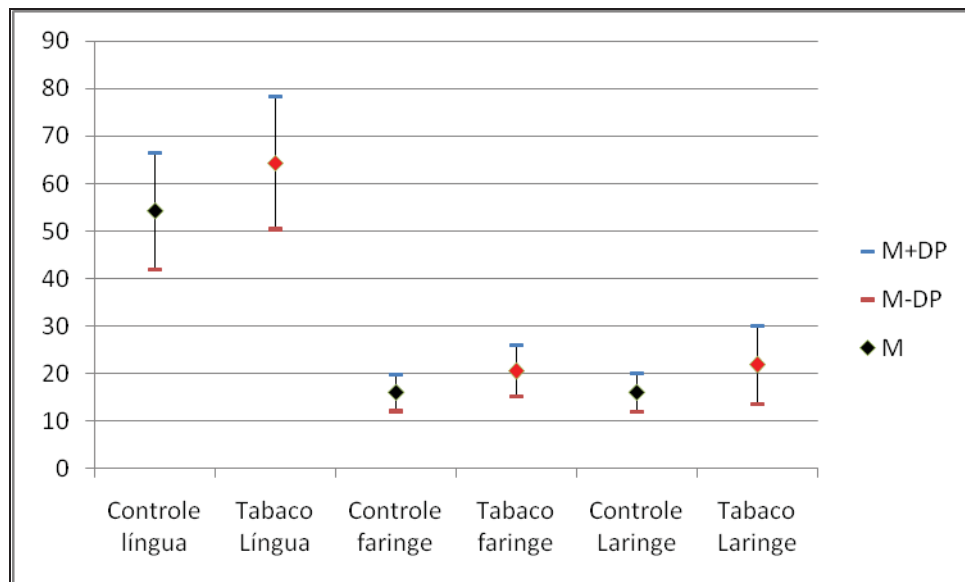


Figura 21- Boxplot da média (M) e Desvio Padrão (DP) da altura da camada de queratina nos três sítios estudados em ambos os grupos

4.3 Estudo Imunohistoquímico

Os resultados das análises imunohistoquímicas dos fragmentos da língua estão apresentados na tabela 5. A imunexpressão da proteína p53 mostrou-se negativa tanto no grupo controle (GC) quanto no grupo tabaco (GT). Ao contrário, a imunexpressão da proteína ki-67 foi detectada em 95% das lâminas do grupo controle (GC) e em 75% do grupo tabaco (GT). No grupo controle, a pigmentação acastanhada dos núcleos restringiu-se às células da camada basal (figuras 22 e 23); no grupo tabaco, a imunexpressão comportou-se de forma semelhante, porém em duas lâminas, a coloração se estendeu aos núcleos das células das camadas parabasais (figura 24). Na maioria das lâminas de ambos os grupos toda extensão do fragmento mostrava células com núcleos pigmentados.

Tabela 5. Imunexpressão dos anticorpos P53 e Ki- 67 nos fragmentos de língua.

Parâmetros	GC-Controle										GT-Tabaco									
	Extensão epitélio					Extensão fragmento					Extensão epitélio					Extensão fragmento				
Escore	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%
P-53 (p=1,0)	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0
ki-67 (p=0,81)	1	19	0	0	95	1	1	1	17	95	5	13	2	0	75	5	0	0	15	75

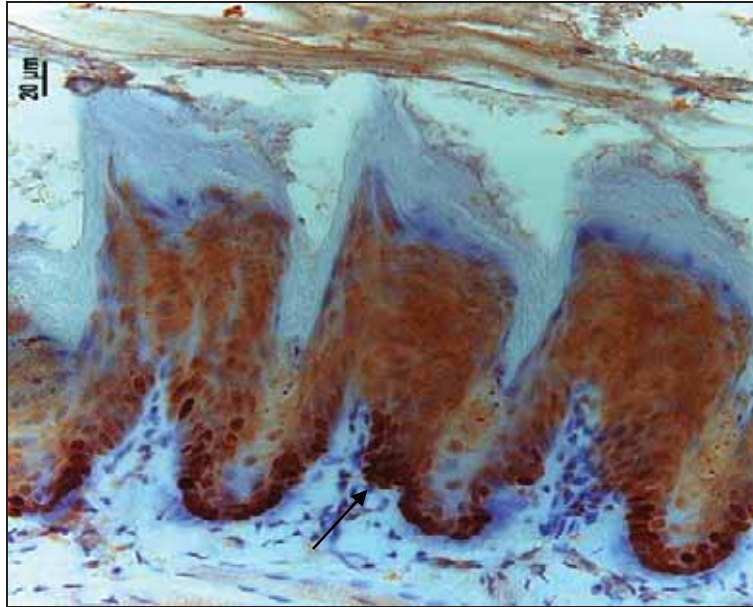


Figura 22- Epitélio da língua de animais do grupo controle (GC). Imunomarcção do anticorpo Ki-67 mostrando coloração acastanhada dos núcleos apenas das células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).

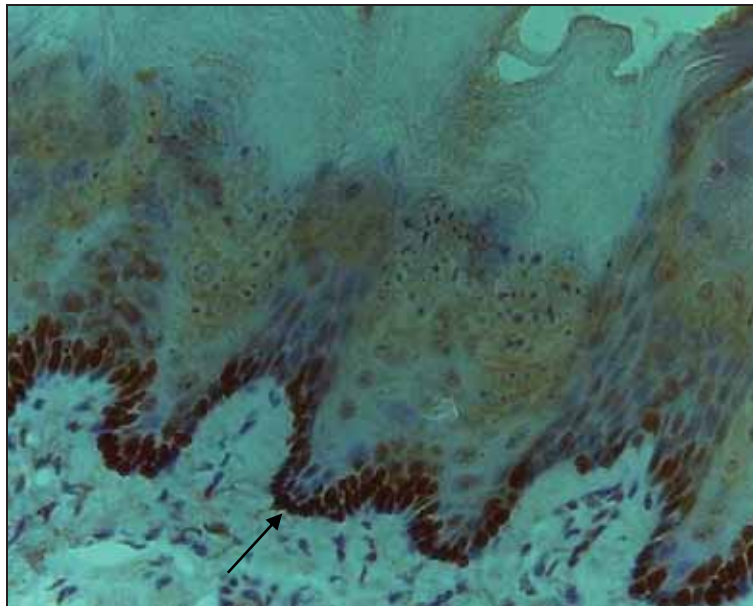


Figura 23- Epitélio da língua de animais do grupo Tabaco (GT). Imunomarcção do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).

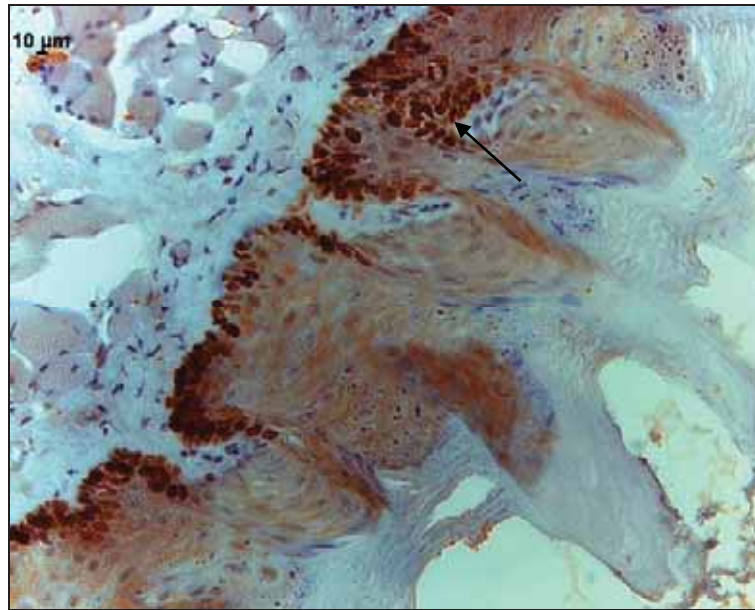
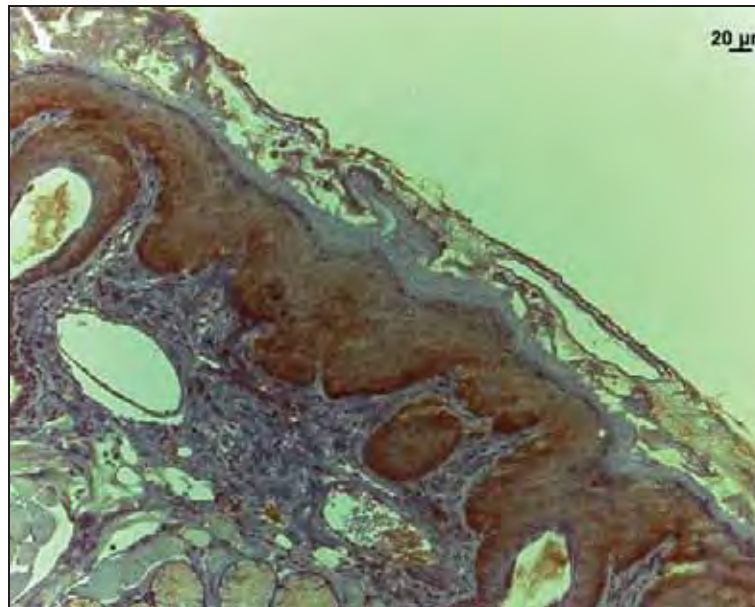


Figura 24- Epitélio da língua de animais do grupo tabaco (GT). Imunomarcção do anticorpo Ki-67abrangendo células da camada basal e parabasal (seta). Microscopia de Luz, (80 X).

Os resultados das análises imunohistoquímicas dos fragmentos da faringe estão apresentados na tabela 6. Na análise da expressão da proteína p53, a imunomarcção foi negativa em todas as lâminas de ambos os grupos, repetindo o padrão das análises da língua (figura 25). A expressão da proteína ki-67 mostrou-se positiva em 55% das lâminas do grupo controle (GC) e em 80% das lâminas do grupo tabaco (GT) ilustrados nas figuras 26 e 27. Apenas neste grupo constatou-se pigmentação nos núcleos das células parabasais e, na avaliação da extensão do fragmento, em 11 lâminas havia comprometimento de mais de 50% deste (figura 28).

Tabela 6. Imunoexpressão dos anticorpos P53 e Ki- 67 nos fragmentos de faringe.

Parâmetros	GC-Controle										GT-Tabaco									
	Extensão epitélio					Extensão fragmento					Extensão epitélio					Extensão fragmento				
Escores	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%
P-53 (p=1,0)	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0
ki-67 (p=0,60)	9	11	0	0	55	9	0	4	7	55	4	13	3	0	80	4	1	4	11	80

**Figura 25-** Epitélio da faringe de animais do grupo controle (GC). Ausência de imunomarcacão do anticorpo p 53. Microscopia de Luz, (80 X).

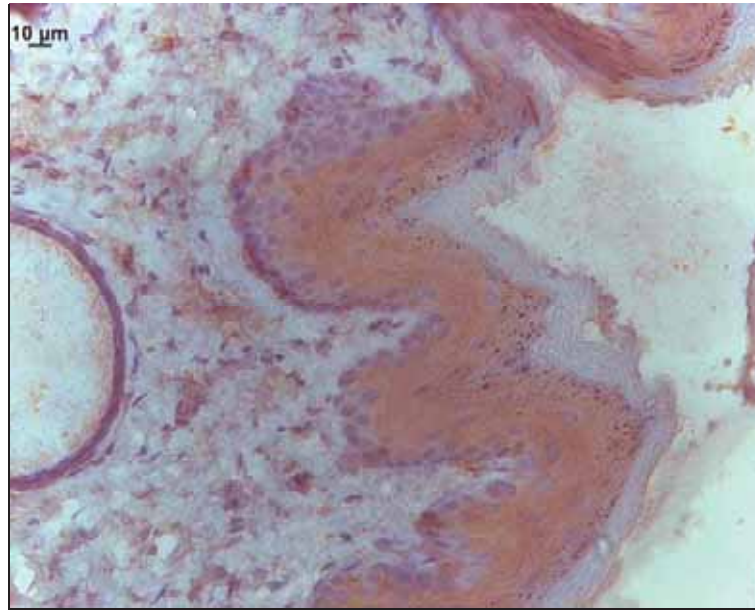


Figura 26- Epitélio da faringe de animais do grupo controle (GC). Ausência de imunomarcacão do anticorpo Ki-67. Microscopia de Luz, (40 X). Hiperplasia na microscopia de luz com imunoexpressão negativa.

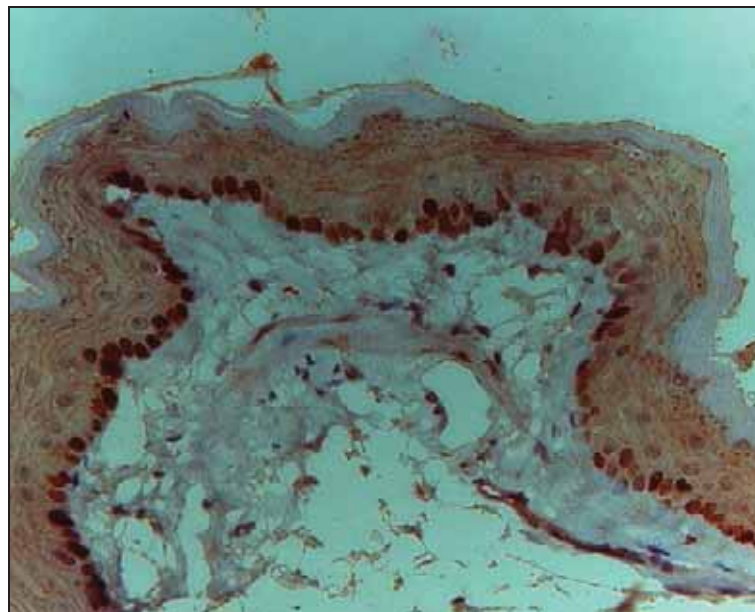


Figura 27- Epitélio da faringe de animais do grupo tabaco (GT). Imunomarcacão do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal. Microscopia de Luz (40 X).

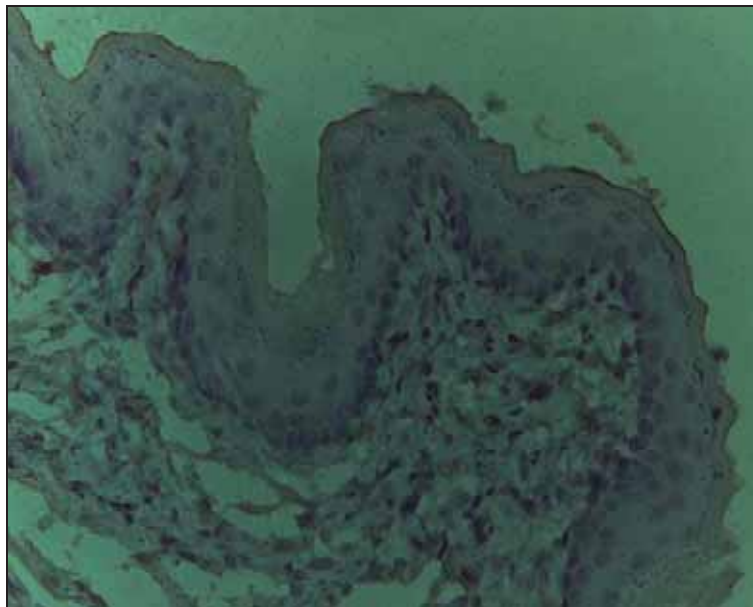


Figura 28- Epitélio da faringe de animais do grupo tabaco (GT). Imunomarcção do anticorpo Ki-67abrangendo células da camada basal e algumas células parabasais (seta). Microscopia de Luz (80 X).

Os resultados das análises imunohistoquímicas dos fragmentos da laringe estão apresentados na tabela 7. A expressão da proteína p53 permaneceu negativa em ambos os grupos, acompanhando o padrão das análises anteriores (Figura 29). A imunomarcção do Ki-67 no grupo controle (GC) mostrou-se positiva em 11 lâminas, restringindo-se às células da camada basal (figura 30), estendendo-se para as camadas parabasais no grupo tabaco (GT) em duas lâminas. A extensão do fragmento mostrou-se mais comprometida nas lâminas do grupo tabaco, no qual nove lâminas foram pontuadas com escore 3, correspondendo ao comprometimento de mais de 50% de sua extensão.

Tabela 7. Imunoexpressão dos anticorpos P53 e Ki- 67 nos fragmentos de laringe.

Parâmetros	GC-Controle										GT-Tabaco									
	Extensão epitélio					Extensão fragmento					Extensão epitélio					Extensão fragmento				
Escore	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%	0	1	2	3	%
P-53 (p=1,0)	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0
ki-67 (p=0,99)	9	11	0	0	55	9	1	9	1	55	8	10	2	0	60	8	1	2	9	60

**Figura 29-** Epitélio da laringe de animais do grupo tabaco (GT). Ausência de imunomarcagem do anticorpo p 53. Microscopia de Luz, (80 X).

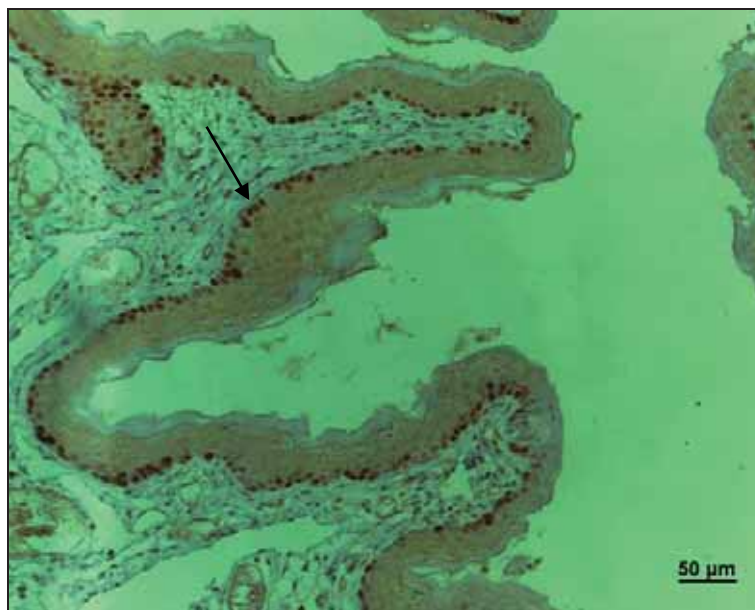


Figura 30- Epitélio da laringe de animais do grupo controle (GC). Imunomarcção do anticorpo Ki-67 restrita às células da camada basal (seta). Microscopia de Luz, (40 X).

5. Discussão

No passado, o paciente tabagista crônico foi motivo de inúmeras pesquisas clínicas, tendo como objetivo revelar os efeitos nocivos do hábito de fumar sobre os diversos sistemas, especialmente sobre as vias aéreas e digestivas (MASON et al.,1985; BENOWITZ, 1999; INCA, 2002; IARC,2004; WHO,2009). A relação entre o hábito de fumar e o desenvolvimento de carcinoma nesses sítios foi também exaustivamente comprovada por diversos autores (DOLL *et al.*,1964; ROTHMAN *et al.*, 1972; BLOT *et al.*, 1988; HASHIBE *et al.*, 2009; LUBIN *et al.*,2011). A divulgação dos resultados dessas pesquisas colaborou para desmascarar as propagandas enganosas divulgadas na imprensa, as quais estimulavam, irresponsavelmente, o hábito de fumar. Essas foram então, paulatinamente substituídas por propagandas que alertavam a população sobre o perigo do cigarro à saúde. Atualmente tem-se procurado demonstrar também os efeitos nocivos da inalação da fumaça de cigarro àqueles que não fumam e se tornam fumantes passivos, estando de certa forma, protegidos pela lei antifumo nos ambientes públicos. Embora muito divulgada, essa lei não é respeitada nos ambientes domésticos e a exposição à fumaça de cigarro pelos familiares, incluindo crianças, é comum em muitos lares.

Paralelamente às evidências clínicas dos efeitos maléficos do cigarro, pesquisas experimentais vêm sendo desenvolvidas há algumas décadas (WALTER et al.,1978; LAM,1980; CARTER et al.,2010). Os modelos experimentais se diferem entre os autores, principalmente quanto ao tempo e o modo de exposição à fumaça do cigarro. Alguns modelos de carcinogênese têm mantido os animais expostos por períodos diferenciados que variam entre uma a 96 semanas. Ratos e camundongos são os animais mais comumente utilizados nesses estudos. Experimentos com hamsters, cachorros e primatas não humanos são menos frequentes, porém não menos importantes (COGGINS, 2001).

Um dos primeiros trabalhos experimentais descritos na literatura que avaliou o efeito da inalação do cigarro em animais de laboratório usando *Hamster syrian*, foi desenvolvido por Dontenwill em 1970. Este autor utilizou uma máquina com sistema fechado de inalação de fumaça e constatou alterações epiteliais na laringe após 10 meses de exposição. O grau de severidade das lesões esteve relacionado à frequência da exposição e ao maior período do experimento, sendo observado carcinoma invasivo após 72 semanas. Anos depois, o mesmo autor submeteu hamsters à inalação da fumaça de cigarro por meio de máscara nasal durante todo o período de suas vidas (DONTENWILL et al.,1974). Os animais foram distribuídos em grupos com concentrações variadas de nicotina (entre 0,4 e 1,6 mg 30 cigarros por dia), contida em seis diferentes marcas comerciais de cigarros. Neste estudo, a laringe foi o sítio mais acometido, sendo identificado carcinoma minimamente invasivo em 10,6% dos animais expostos ao cigarro, com concentração de nicotina padrão de 1,0mg.

Em pesquisa recente, desenvolvida em nossa instituição, ratos foram expostos diariamente à fumaça de cigarro (uma vez ao dia) durante 65 semanas (MADEIRA et al,2012). As análises histológicas das amostras de língua e de faringe revelaram alterações interessantes, como hiperplasia epitelial, hiperkeratose e displasias de diversos graus, incluindo carcinoma *in situ*. Os resultados deste estudo permitiram aos autores deduzir que o principal fator determinante para o desenvolvimento das lesões é, provavelmente, o tempo de exposição e não a quantidade de agentes agressores inalados diariamente, uma vez que nesse estudo, esta ocorria apenas uma vez ao dia durante 30 min.

Balansky et al.(2007) distribuíram 98 animais em três grupos: 36 animais controles, 38 animais mantidos em câmara de inalação com 1mg de nicotina e 24 animais submetidos à injeção subcutânea de 1mg de nicotina durante 120 dias. Este

valioso estudo registrou alterações expressivas no pulmão que se iniciaram após 75 dias de exposição, como o adenocarcinoma, detectado em sete animais submetidos à exposição à fumaça de corpo inteiro. Ao contrário, nos animais do grupo controle e naqueles submetidos à injeção de nicotina, não foram detectadas alterações histológicas relevantes.

Pelas pesquisas elencadas acima se percebe que para a reprodução da carcinogênese em modelos animais é necessário um período mínimo de 75 dias de exposição diária à fumaça de cigarro. Mesmo assim alguns autores consideram a importância de um período maior para essa finalidade. Utilizando um período de exposição de 75 dias, Assis *et al.* (2005), não identificaram lesões neoplásicas no epitélio respiratório de animais (ratos), sendo observado apenas alterações benignas como hiperplasia e metaplasia leve do epitélio. Resultados semelhantes foram apontados por Duarte *et al.* (2006), durante a análise histológica de biópsias de laringe de ratos expostos aos mesmos agentes agressores durante 25, 50 e 75 dias. Assim, período inferior a 75 dias deve ser reservado aos estudos que almejam analisar lesões em vias aéreas nas fases iniciais da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação. No presente estudo, o tempo do experimento se restringiu a 60 dias, sendo constatadas lesões benignas como hiperplasia epitelial, aumento da camada de queratina e displasia de grau leve, à semelhança dos últimos autores. Nos segmentos da língua e da faringe, sítios mais próximos da exposição, as displasias foram mais frequentes que na laringe, na qual predominou processo inflamatório e congestão.

A metodologia da exposição à fumaça de cigarro é bastante discutida entre os autores. Em alguns estudos, a exposição se dá por meio de injeção intraperitoneal de nicotina (ETSCORN *et al.*, 1986; VALENCA *et al.*, 2004; BALANSKY *et al.*, 2007); em outros esta é realizada pela inalação da fumaça do cigarro, utilizando-se uma

máscara nasal ou mantendo o animal totalmente exposto no interior de uma câmara, tipo de exposição denominada de “corpo inteiro”(Balansky *et al.*,2007; Madeira *et al.*, 2012). Mauderly *et al.*(2004) expuseram ratos do gênero CDF (F344) à inalação de fumaça de cigarro do tipo corpo inteiro durante 30 meses (120semanas) e variaram a concentração de nicotina (baixa concentração:100 mg/m³ ; alta concentração:250 mg/m³). Observaram diversas lesões pulmonares e nasais como hiperplasia, lesões benignas e malignas. Lesões como metaplasia e hiperplasia da cavidade nasal foram mais severas nos animais submetidos à alta concentração de nicotina. Neste grupo, lesões malignas pulmonares também foram evidenciadas em 6,1% nos machos e em 4,9% das fêmeas.

Na metodologia que utiliza máscara nasal, a inalação a fumaça de cigarro se aproxima mais da prática do tabagismo, uma vez que o agente agressor atinge diretamente as fossas nasais e a cavidade oral. Essa exposição permite o estudo da ação térmica do cigarro nos sítios de maior contato como narinas, lábios, mucosa oral e faringe. O inconveniente do método é a dificuldade na adaptação e na manutenção do dispositivo no focinho dos animais, por período mais prolongado. Por outro lado, a exposição ao corpo inteiro se assemelha à vivenciada pelo fumante passivo e tem a vantagem de ser bem tolerada pelos animais, mesmo em experimentos de longa duração. No entanto, parte das partículas dos poluentes fica depositada na superfície dos animais, podendo ser identificada pela coloração amarelada de seus pêlos, durante o experimento. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada por muitos autores (PAIVA *et al.*,2003; MAUDERLY *et al.*, 2004; ASSIS *et al.*, 2005; BALANSKY *et al.*, 2007; MADEIRA, 2010). Segundo Hecht (2005), a exposição de nicotina pela metodologia de corpo inteiro é duas vezes maior do que quando restrita às narinas, destacando-a entre as demais técnicas de exposição. Os autores reforçam a importância do modelo animal no estudo do câncer induzido pela inalação da fumaça de cigarro por

viabilizarem as pesquisas de novos biomarcadores e de agentes quimiopreventivos no câncer de pulmão, laringe, cavidade nasal, dentre outros sítios.

Em pesquisa realizada nas mesmas condições experimentais do presente estudo, Castardeli et al (2005) estudando a remodelação cardíaca em animais expostos à inalação de fumaça de cigarro, entre outros parâmetros, analisaram os níveis sanguíneos da carboxihemoglobina por meio da gasometria. Os autores observaram níveis mais elevados de carboxihemoglobina nos animais do grupo tabaco ($5,3 \pm 2,8$ mg/dl) quando comparados ao controle ($0,9 \pm 0,7$ mg/dl), permitindo-lhes validar essa metodologia da exposição ao corpo inteiro à fumaça de cigarro nesses estudos.

No presente estudo, os animais do grupo tabaco (GT) foram expostos ao corpo inteiro à fumaça de cigarro, quatro vezes ao dia durante 60 dias consecutivos e as análises histológicas revelaram algumas alterações nos sítios estudados, as quais embora benignas, não foram identificadas nos animais do grupo controle (GC), ou quando presentes foram registradas em menor intensidade. A hiperplasia de células das camadas epiteliais foi um achado constante nas análises histológicas dos animais de GT, nos três sítios estudados (língua, faringe e laringe). As células epiteliais da camada basal estão em constante atividade, e têm como principal função a reposição das células em descamação. Em resposta a um estímulo contínuo, estas se multiplicam e se diferenciam. Caso a agressão persista, o epitélio superficial pode sofrer proliferação em ritmo acelerado, resultando em queratinização e metaplasia epitelial (KUMAR et al., 2005). Neste estudo, a queratinização observada em língua, faringe e laringe, mais proeminente nos animais expostos à fumaça de cigarro, ficou evidente na análise histomorfométrica. A queratinização foi mais pronunciada nas regiões da faringe e laringe, fato interpretado como resposta do epitélio aos agentes irritativos inalados. A superfície da língua também apresentou aumento da camada de queratina, porém de

forma menos acentuada, uma vez que esse sítio é adaptado aos hábitos alimentares agressivos desses animais e apresenta naturalmente a camada de queratina mais desenvolvida. Resultados semelhantes foram constatados por Haussmann *et al.*(1998) os quais identificaram aumento da espessura da camada epitelial na laringe de ratos expostos durante 90 dias à fumaça de cigarro seis horas por dia, sete dias na semana.

Em estudo em humanos, Hirabayashi *et al.*(1990) compararam as laringes de cadáveres (84 homens e 48 mulheres) de ex-tabagistas e ex-etilistas com as de portadores ativos desses hábitos e observaram aumento significativo na espessura do epitélio supraglótico e das pregas vocais nestes últimos, confirmando a resposta protetora do epitélio ao agente agressor.

A exposição continuada aos agentes agressores ao epitélio pode culminar com o desenvolvimento de displasias epiteliais de diversos graus. No presente estudo, apenas displasias leves foram identificadas nos animais expostos à fumaça de cigarro por 60 dias (GT), principalmente nos fragmentos de língua e faringe. Displasias mais graves ou carcinoma não foram detectados em nenhum dos animais.

Bolton *et al.*,(2009), utilizando a mesma metodologia de inalação de corpo inteiro, descreveram metaplasia escamosa epitelial no trato respiratório, que incluiu brônquios e bronquíolos, de ratos após sete e 14 semanas de exposição. A resposta mais intensa dos segmentos respiratórios mais baixos aos agentes agressores pode ser justificada pelas particularidades dos epitélios de cobertura dos locais estudados. O epitélio respiratório ciliado, que recobre as fossas nasais, traquéia, brônquios e bronquíolos, é provavelmente menos resistente que o epitélio pavimentoso estratificado, que recobre as superfícies da boca, da faringe e laringe. A fragilidade do epitélio respiratório à inalação à fumaça de cigarro foi constatada por Hutt *et al.*, (2005), em experimento no qual camundongos fêmeas (B6C3F1) foram expostos durante 930 dias à

inalação de fumaça seis horas por dia, cinco dias na semana, com 250 mg partículas/ m³. Os autores descrevem lesões pulmonares nos animais expostos à fumaça e nos controles nas seguintes proporções, respectivamente: lesões benignas em 31% e 7%; adenoma pulmonar em 28% e 6,7%; adenocarcinoma em 20% e 2,8%. Nos animais expostos, os autores detectaram ainda lesões em cavidade nasossinusal como rinite neutrofílica, sinusite, hiperplasia epitelial, metaplasia escamosa e atrofia do bulbo olfatório. Lesões malignas neste sítio foram registradas em apenas 20 animais dentre os 330 expostos (6,1%), sendo nove carcinomas invasivos, cinco carcinomas *in situ*, cinco hemangiomas e um papiloma.

Nos estudos que envolvem roedores, deve-se salientar que nesses animais, uma espessa camada de queratina recobre toda a extensão do epitélio pavimentoso, desde a língua até a laringe. Representa importante resposta adaptativa aos hábitos alimentares rudimentares e lhes confere maior proteção contra lesões. No entanto, na laringe pode-se constatar diversas áreas de transição entre o epitélio respiratório e o pavimento, o que provavelmente torna esse sítio mais vulnerável aos agentes agressores (Lewis e Prentice, 1980). Essa fragilidade pode explicar as lesões laríngeas registradas por alguns autores nas pesquisas experimentais. Walter *et al.*, (1978) demonstraram metaplasia escamosa e hiperplasia epitelial na laringe de ratos expostos a inalação de fumaça duas vezes ao dia por somente seis semanas.

Displasia corresponde a um desarranjo na arquitetura celular acompanhado de proliferação celular atípica. É classificada em leve, moderada e grave, dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas (KUMAR *et al.*, 2005; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008). No modelo animal seu desenvolvimento parece estar diretamente relacionado ao tempo prolongado de exposição ao agente agressor, sendo raramente identificada em experimentos de curta

duração. A displasia é parte integrante dos processos iniciais da carcinogênese, na qual são citados três estágios: de iniciação, de promoção e de progressão. No primeiro estágio (de iniciação) as células são danificadas ou alteradas geneticamente; no segundo estágio, essas células sofrem ação dos agentes denominados oncopromotores e estão aptas a iniciar a multiplicação; no estágio de progressão inicia-se a proliferação das células alteradas. O período desses estágios varia para cada tipo de neoplasia. Assim, neste estudo, como o experimento teve duração de somente 60 dias, observou-se apenas os eventos relacionados ao estágio inicial da carcinogênese como inflamação, hiperplasia epitelial e displasia leve a moderada, como constam nos resultados, especificamente nos animais de GT.

No intuito de estudar experimentalmente a evolução da carcinogênese em animais, Salley (1957) foi um dos pioneiros a destacar o processo inflamatório como importante indutor das fases iniciais da carcinogênese. Wu *et al.*, (2006), expondo ratos à inalação de fumaça de cigarro por apenas 30 dias (30 minutos, duas vezes ao dia, a uma taxa de cinco, 10 e 15 cigarros/dia), evidenciaram importante infiltrado linfocitário e congestão em parênquima pulmonar. O grau de inflamação esteve diretamente relacionado à carga tabágica. O processo inflamatório, embora de intensidade moderada, foi também identificado no presente estudo, especialmente nos fragmentos da laringe dos animais do grupo GT, sendo representado pelo aumento da vascularização e infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos. Resultados semelhantes foram evidenciados por Assis *et al.*, (2005), durante análise da mucosa laríngea de ratos expostos ao tabaco por 75 dias, bem como por Carter e Mirsa (2010), que registraram aumento do número de macrófagos alveolares em ratos expostos ao tabaco.

A necessidade de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos relacionados à carcinogênese alavancou pesquisas com marcadores tumorais.

Guttenplan et al.,(2011), por meio de análises imunohistoquímicas, avaliaram os efeitos do benzo[a]pyrene sobre a cavidade oral de camundongos fêmeas B6C3F1, constatando expressão elevada da proteína p53 em carcinomas de cavidade oral e em áreas de displasia. A imunomarcção da p53 nos carcinomas espinocelulares foi comprovada por Anwar *et al.*, (1993), em análise comparativa de 43 pacientes com diagnósticos laríngeos de lesões benignas (nódulos), lesões malignas (carcinoma, áreas de metástase ou de recidiva) ou áreas sem lesões (laringes normais). A imunopositividade da p53 foi registrada em 60% dos carcinomas de laringe, em 69% das aéreas metastáticas e 80% das lesões recidivantes. Em nódulos ou nas laringes normais a imunoexpressão da p53 foi negativa, demonstrando o elevado grau de especificidade desse marcador tumoral para carcinoma espinocelular.

Marcadores tumorais têm sido utilizados não apenas na identificação de áreas displásicas e neoplásicas, mas também no prognóstico de tumores e identificação de margens cirúrgicas comprometidas. Para o carcinoma espinocelular, mais freqüente nas vias aéreas e digestivas altas, os anticorpos p53 e Ki-67 têm sido os mais utilizados. O gene TP 53 encontra-se alterado em 42% dos carcinomas de cabeça e pescoço (em 60% dos tumores de laringe e em 37% dos tumores de hipofaringe) (MAESTRO et al.,1992; FRANK et al., 1994; BRENNAN et al., 1995; OLSHAN et al., 1997; PETITJEAN et al., 2007). A imunoexpressão positiva da proteína p53 sinaliza para a existência de mutação da mesma, uma vez que em sua forma selvagem, pela sua meia vida fugaz, apresenta-se negativa. Quando mutada, a proteína p53 perde a capacidade de vigiar as ocorrências de mutações celulares, proliferações atípicas ou danos ao DNA, culminando com o desenvolvimento do carcinoma. Pela sua grande expressão nos carcinomas espinocelulares, ela é considerada um marcador tumoral muito importante na identificação precoce de células neoplásicas no processo de carcinogênese, o que justifica a escolha desse anticorpo na metodologia deste estudo.

No presente estudo as análises imunohistoquímicas não revelaram positividade para esses anticorpos, resultado já esperado frente à ausência de displasias graves e de carcinoma nas amostras histológicas analisadas nos três sítios de ambos os grupos de estudo.

Embora a imunoexpressão positiva da p53 esteja fortemente relacionada ao carcinoma espinocelular, alguns autores têm ressaltado sua positividade em lesões pré-neoplásicas como leucoplasias, displasias e papilomatose laríngea, merecendo cautela na interpretação dos resultados. Para Klumb *et al.*, (2002) a positividade registradas nestes casos não está relacionada à mutação da p53, mas à possíveis ligações com proteínas virais, à outras proteínas, ou mesmo à sua forma selvagem. Assim, a interpretação da imunoexpressão da p53 no diagnóstico das neoplasias deve ser interpretada com cautela. Por outro lado, a identificação precoce de áreas displásicas em pacientes fumantes crônicos é importante devido à elevada probabilidade de transformação maligna. Weller *et al.*, (2010), em recente revisão sistemática e de meta-análise, que avaliou o risco de transformação maligna das displasias laríngeas, constataram taxa média de transformação maligna de 14% em laringes displásicas, sendo 10,6% para as displasias leves a moderadas e 30,4% para as displasias graves.

A imunoexpressão da p53 tem sido relacionada também ao prognóstico dos tumores (Jayasurya *et al.*, 2005; Tandon *et al.*, 2010). Em interessante revisão sistemática, Tandon *et al.*, (2010) avaliaram o papel da proteína p53 na indicação do tempo de sobrevida de pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço (língua, orofaringe, hipofaringe e laringe). Os autores constataram que o valor prognóstico de sobrevida em dois anos desse imunomarcador tumoral foi significativo somente para o carcinoma oral, sendo inconclusivo para os demais sítios.

O anticorpo Ki-67 tem sido muito estudado em neoplasias de cabeça e pescoço, sendo importante sinalizador de áreas com intensa proliferação celular, atuando em quase todas as fases do ciclo celular (BROWN *et al.*, 1990; SCHOLZEN *et al.*, 2000). A proliferação celular é considerada um importante evento biológico envolvido na carcinogênese, justificando sua análise nos estudos. No presente estudo, nos fragmentos de língua, faringe e laringe a imunoexpressão da ki-67 mostrou-se positividade, respectivamente em 15, 16 e 12 lâminas do grupo tabaco (GT) e em 19, 11 e 11 lâminas do grupo controle (GC), indicando pouca especificidade para identificação de células comprometidas pelo agente agressor. No grupo controle (GC) a positividade se restringiu aos núcleos das células da camada basal; porém no grupo tabaco (GT), esta se estendeu às células das camadas parabasais e até mesmo às das camadas apicais, indicando um grau maior de comprometimento nesse grupo.

Zidar *et al.*, (1996) avaliaram 50 biópsias de laringe de pacientes fumantes, dividindo histologicamente seus epitélios em normais, hiperplásicos, com ou sem atipias, segundo a classificação de Kambic-Lenart (KAMBIC *et al.*, 1971). Os autores registraram 20 casos de carcinoma espinocelular, sendo a imunoexpressão do anticorpo ki-67 positiva em todos os casos, indicando ser este forte sinalizador de proliferação celular. Cor *et al.*, (1997), em estudo com 40 biópsias de laringe classificadas como o estudo anterior, constataram 12,2% de positividade para o ki-67 nas lâminas com epitélio normal, 16% nas lâminas com áreas displásicas sem atipias, 25,7% nas lâminas com displasia com atipia e 33,8% de positividade nos carcinomas *in situ*. Segundo estes autores, a fração de proliferação do Ki-67 aumenta com o grau de severidade da hiperplasia. A falta de especificidade do ki-67 para lesões malignas, foi constatada também nos resultados deste estudo, bem como a relação entre o aumento do escore com a severidade da alteração histológica.

Rittá *et al.*,(2008), estudando a imunexpressão da ki-67 em 59 casos de carcinoma espinocelular de orofaringe, cavidade oral e laringe, observaram que o padrão da imunomarcção restrito aos núcleos das células das camadas basais, é achado frequente no epitélio normal e que a extensão às demais camadas de células epiteliais é o padrão observado nas áreas displásicas e nas neoplasias. Essas observações puderam ser constatadas no presente estudo.

Com o modelo animal de reprodução de carcinogênese oral em hamsters Vairaktaris *et al.*, (2008) utilizaram o 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno durante 10, 14 e 19 semanas e descreveram a evolução dos eventos da carcinogênese oral, partindo da hiperkeratose e da hiperplasia epitelial, até o desenvolvimento da displasia e do carcinoma. A imunexpressão do p53 aumentou gradualmente com o desenvolvimento tumoral, porém a imunexpressão do ki-67 elevou-se nos estágios iniciais da carcinogênese oral e diminuiu nos estágios posteriores. Esses resultados demonstram a maior especificidade da p53 sobre o anticorpo ki-67 na identificação de células neoplásicas.

Pela análise conjunta dos resultados deste estudo constata-se que a exposição dos animais durante 60 dias à inalação de fumaça de cigarro culminou com danos epiteliais benignos nos sítios estudados, mais evidentes em língua e em faringe, representados pela hiperplasia epitelial, aumento da camada de queratina e displasia de grau leve. O tempo de exposição não foi suficiente para desenvolver displasia grave ou neoplasia, justificando a imunexpressão negativa da proteína p-53 em todas as lâminas estudadas. A elevada taxa de imunexpressão positiva da proteína ki-67 em ambos os grupos, porém mais evidente nos animais expostos à fumaça de cigarro, indicou proliferação epitelial intensa e resposta mais expressiva ao agente inalatório.

6. Conclusão

A exposição de animais à fumaça de cigarro durante 60 dias resultou em lesões benignas, identificadas pela microscopia de luz como hiperplasia epitelial, aumento da camada de queratina e displasia de grau leve, alterações estas mais evidentes nos fragmentos da língua e da faringe. O tempo de exposição não foi suficiente para desenvolver displasia de grau mais intenso ou neoplasia nos sítios examinados, confirmado pela imunoexpressão negativa da proteína p53 em todas as lâminas examinadas. A elevada taxa de imunoexpressão positiva da proteína ki-67 em ambos os grupos, porém mais evidente nos animais expostos à fumaça de cigarro, indica proliferação epitelial intensa e resposta ao dano.

7. Referências

ALVARENGA, L.M. *et al.* Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. Rev. Bras. Otorrinolaringol., v.74, n.1, p.68-73, 2008.

ANDREOTTI, M. *et al.* Occupational status and cancer of the oral cavity and oropharynx. Cad. Saude Publica, v.22, n.3, p.543-552, 2006.

ANWAR, K. *et al.* Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. Int. J. Cancer, v.53, n.6, p.952-956, 1993.

ASSIS, G.F. *et al.* Cigarette smoke affects apoptosis in rat tongue mucosa: role of bcl-2 gene family. J. Mol. Histol., v.36, n.8-9, p.483-489, 2005.

BALANSKY, R. *et al.* Differential carcinogenicity of cigarette smoke in mice exposed either transplacentally, early in life or in adulthood. Int. J. Cancer, Apr. 11. 2007. doi: 10.1002/ijc.26103

BANOCZY, J.; CSIBA, A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., v.42, n.6, p.766-774, 1976.

BENOWITZ, N.L. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. Environ. Health Perspect., v.107, Suppl. 2, p.349-355, 1999.

BLOT, W.J. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res., v.48, n.11, p.3282-3287, 1988.

BOLTON, S.J. *et al.* Characterisation of the proximal airway squamous metaplasia induced by chronic tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive rats. Respir. Res., v.10, p.118, 2009.

BOYLE, J.O. *et al.* The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer Res., v.53, n.19, p.4477-4480, 1993.

BOYLE, P.; LEVIN, B. World Cancer Report 2008. Lyon: IARC, 2008.

BRENER, S. *et al.* Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. Rev. Bras. Cancerol., v.53, n.1, p.63-69, 2007.

BRENNAN, J.A. *et al.* Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N. Engl. J. Med., v.332, n.11, p.712-717, 1995.

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology, v.17, n.6, p.489-503, 1990.

CABANILLAS, R. *et al.* P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question. Cancer, v.109, n.9, p.1791-1798, 2007.

CAMPOS, C.A.H.; COSTA, H.O.O. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca, 2003. v.4.

CARTER, C.A.; MISRA, M. Effects of short-term cigarette smoke exposure on Fischer 344 rats and on selected lung proteins. Toxicol. Pathol., v.38, n.3, p.402-415, 2010.

CASTAÑEDA, D.B. *et al.* Revision bibliográfica de p53: vias de senalización Y papel el proceso de carcinogenesis. Rev. Cir. Traumatol. Buco-maxilo-fac., v.7, n.2, abr./jun. 2007.

COGGINS, C.R. A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke in rats and mice. Toxicol. Pathol., v.26, n.3, p.307-314, 1998.

CASTARDELI, E.; PAIVA, S.A., *et al.* [Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats]. Arq Bras Cardiol, v.84, n.4, Apr, p.320-4. 2005.

COGGINS, C.R. A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke, in hamsters, dogs, and nonhuman primates. Toxicol. Pathol., v.29, n.5, p.550-557, 2001.

-
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. Rev. Bras. Cancerol., v.55, n.2, p.165-174, 2009.
- COR, A. *et al.* Quantitative pathology of laryngeal epithelial hyperplastic lesions. Acta Otolaryngol. Suppl., v.527, p.57-61, 1997.
- COSTA, S.S. *et al.* Otorrinolaringologia: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed, p.983-996, 2006.
- COTRAN, R. *et al.* Neoplasias. In: Pathologic basis of disease 5 ed. New York: W. B. Saunders, 1994. p.247.
- DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry, v.13, p.795-808, 1992.
- DAY, G.L.; BLOT, W.J. Second primary tumors in patients with oral cancer. Cancer, v.70, n.1, p.14-19, 1992.
- DAYAN, D. *et al.* Experimental tongue cancer in desalivated rats. Oral Oncol., v.33, n.2, p.105-109, 1997.
- DE PAULA, A.M. *et al.* Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. Oral Oncol., v.45, n.9, p.777-782, 2009.
- DEDIVITIS, R.A. *et al.* Características clínicoepidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe Rev. Bras. Otorrinolaringol., v.70, n.1, p.35-40, 2004.
- DENG, G. *et al.* [The expression of ki-67, topoIIalpha in laryngeal squamous cell carcinoma]. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, v.19, n.9, p.396-398, 2005.
- DENG, Z. *et al.* Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., v.268, n.11, p.1625-1631, 2011.
-

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. Cancer Metastasis Rev., v.24, n.1, p.9-17, 2005.

DOLL, R.; HILL, A.B. Mortality in relation to smoking: ten years' observations of british doctors. Br. Med. J., v.1, n.5395, p.1399-1410, 1964.

DONTENWILL, W.P. Experimental Investigations on the effect of cigarette smoke inhalation on small laboratory animals. In: HANNA, M.G.; NETTESHEIM, P.; GILBERT, J.R. (Eds.). Inhalation carcinogenesis. Springfield: NTIS, 1970.

DONTENWILL, W.P. *et al.* Investigations on the effects of chronic cigarette-smoke inhalation in Syrian Golden hamsters. J. Natl. Cancer Inst., v.51, p.1781-1832, 1974.

DUARTE, J.L. *et al.* Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. Braz. J. Otorhinolaryngol., v.72, n.2, p.210-216, 2006.

ETSCORN, F.; MOORE, G.A., *et al.* Saccharin aversions in hamsters as a result of nicotine injections. Pharmacol Biochem Behav, v.24, n.3, Mar, p.567-70, 1986.

FANT, R.V.; HENNINGFIELD, J.E. Pharmacology and abuse potential of cigars: smoking and tobacco control Monographs. Bethesda: National Cancer Institute, 1998.p.232.

FARDIN, M. *et al.* Fatores de risco no prognóstico do câncer da boca. Estudo de 1440 casos. Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço, v.33, n.1, p.27-33, 2004.

FETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.24, n.2, p.85-89, 2002.

FRANK, J.L. *et al.* p53 tumor suppressor oncogene expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. Cancer, v.73, n.1, p.181-186, 1994.

GASCO, M.; CROOK, T. p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know. Drug Resist. Updat., v.6, n.6, p.323-328, 2003.

GONZÁLEZ, I. *et al.* Tumores amigdalinos: aspectos clínicos e histopatológicos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello, v.64, p.223-229, 2004.

GORBAN, N.A. *et al.* [Ki-67 and p53 expression as prognosticators of clinical course aggressiveness of squamous cell cancer of the larynx]. Vopr. Onkol., v.53, n.6, p.668-673, 2007.

GOULART FILHO, J.A.V. *et al.* Expressão imuno-histoquímica da ciclooxigenase-2 e p53 em carcinoma epidermóide oral. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

SÃO PAULO. Governo do Estado de São Paulo. Lei nº 13.541, de 7 de maio de 2009. Proíbe o consumo de cigarros, cigarrilhas, charutos, cachimbos ou de qualquer outro produto fumígeno, derivado ou não do tabaco, na forma que especifica. Disponível em: <<http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2009/lei%20n.13.541,%20de%2007.05.2009.htm>>. Último Acesso em: 03/01/2012

GRABENBAUER, G.G. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., v.48, n.4, p.1041-1050, 2000.

GUERRA, M.R. *et al.* Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. Rev. Bras. Cancerol., v.51, n.3, p.227-234, 2005.

GUTTENPLAN, J.B. *et al.* Mutagenesis and carcinogenesis induced by dibenzo[a,l]pyrene in the mouse oral cavity: a potential new model for oral cancer. Int. J. Cancer, Aug 3, 2011. doi: 10.1002/ijc.26344

HASHIBE, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v.18, n.2, p.541-550, 2009.

HAUSSMANN, H.J. *et al.* Comparison of fresh and room-aged cigarette sidestream smoke in a subchronic inhalation study on rats. Toxicol. Sci., v.41, n.1, p.100-116, 1998.

HECHT, S.S. Carcinogenicity studies of inhaled cigarette smoke in laboratory animals: old and new. Carcinogenesis, v.26, n.9, p.1488-1492, 2005.

HELLQUIST, H. *et al.* Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. Histopathology, v.34, n.3, p.226-233, 1999.

HIRABAYASHI, H. *et al.* Laryngeal epithelial changes on effects of smoking and drinking. Auris Nasus Larynx, v.17, n.2, p.105-114, 1990.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. J. Nippon Med. Sch., v.73, n.2, p.54-64, 2006.

HUTT, J.A. *et al.* Life-span inhalation exposure to mainstream cigarette smoke induces lung cancer in B6C3F1 mice through genetic and epigenetic pathways. Carcinogenesis, v.26, n.11, p.1999-2009, 2005.

IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004.

INCA. Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

INCA. Falando sobre câncer da boca. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Secretaria de Assistência à Saúde, p.52, 2002.

-
- INOUE, D.P. *et al.* Marcadores tumorais no câncer de laringe. Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço, v.34, n.1, p.7-14, 2005.
- JARDIM, J.R. *et al.* An inhalation chamber model for controlled studies of tobacco smoke toxicity in rodents. Arch. Bronconeumol., v.46, n.9, p.455-458, 2010.
- JAYASURYA, R. *et al.* Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. Mod. Pathol., v.18, n.8, p.1056-1066, 2005.
- KAMBIC, V.; LENART, I. [Our classification of hyperplasia of the laryngeal epithelium from the prognostic point of view]. J. Fr. Otorhinolaryngol. Audiophonol. Chir. Maxillofac., v.20, n.10, p.1145-1150, 1971.
- KLUMB, C.E.; CAVALCANTI JÚNIOR, G.B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.24, n.2, p.111-125, 2002.
- KUMAR, V. *et al.* Adaptação, Dano e Morte Celular. In: Patologia: Bases Patológicas das Doenças: Robbins & Cotran. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p.3-48, 2005.
- KUMAR, V. *et al.* bases patológicas das doenças/ Vinay Kumar.. [et al]; [tradução de Patrícia Dias Fernandes... et al.], -Rio de Janeiro: Elsevier, 2010
- LAFOREST, L. *et al.* Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. Occup. Environ. Med., v.57, n.11, p.767-773, 2000.
- LAM, R. Transient epithelial loss in rat larynx after acute exposure to tobacco smoke. Toxicol. Lett., v.6, n.4-5, p.327-335, 1980.
- LAMBERT, R. *et al.* Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., v.23, n.8, p.633-641, 2011.
-

LEE, Y.C. *et al.* Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v.17, n.8, p.1974-1981, 2008.

LEITE, I.C.G.; KOIFMAN, S. Revisão dos fatores de risco para o câncer de boca e faringe. Rev. Bras. Cancerol., v.44, n.4, Out/Nov/Dez. 1998.

LENNARTSSON, P.; STENIUS, U., *et al.* p53 expression and TGF- α -induced replication of hepatocytes isolated from rats exposed to the carcinogen diethylnitrosamine. Cell Biol Toxicol, v.15, n.1, Feb, p.31-9. 1999.

LEWIS, D.J.; PRENTICE, D.E. The ultrastructure of rat laryngeal epithelia. J. Anat., v.130, pt. 3, p.617-632, 1980.

LIU, M. *et al.* Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., v.260, n.1, p.28-34, 2003.

LOPES, L.F. *et al.* Improvement in the outcome of children with germ cell tumors. Pediatr. Blood Cancer, v.50, n.2, p.250-253, 2008.

LOTHAIRE, P. *et al.* Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. Head Neck, v.28, n.3, p.256-269, 2006.

LUBIN, J.H. *et al.* An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking, and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx in pooled data from 15 case-control studies. Cancer Causes Control, v.22, n.9, p.1217-1231, 2011.

LUO, K. *et al.* Effect of expression of p53 in squamous cell carcinoma of larynx and mucosa adjacent to tumor on the biological behavior. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, v.19, n.9, p.405-408, 2005.

MADEIRA, S.L.M. *et al.* Effects to exposure of tobacco-smoke and alcohol-liquid on the tongue and pharynx of rats. Inhal Toxicol, 2012 in press.

MAESTRO, R. *et al.* High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. Oncogene, v.7, n.6, p.1159-1166, 1992.

MASON, R.J. *et al.* Cigarette smoking and health. Am. Rev. Respir. Dis., v.132, n.5, p.1133-1136, 1985.

MAUDERLY, J.L. *et al.* Chronic inhalation exposure to mainstream cigarette smoke increases lung and nasal tumor incidence in rats. Toxicol. Sci., v.81, n.2, p.280-292, 2004.

MENEZES, A.M. *et al.* Attributed risk to smoking for lung cancer, laryngeal cancer and esophageal cancer. Rev. Saúde Pública, v.36, n.2, p.129-134, 2002.

MINICUCCI, E.M. O papel da proteína p53 e do gene TP53 na carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO em ratos. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

MOTTA RDA, R. *et al.* Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. Braz. J. Otorhinolaryngol., v.75, n.4, p.544-549, 2009.

NEVILLE, B.W. *et al.* Patologia oral & maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.705p.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J. Clin., v.52, n.4, p.195-215, 2002.

NOCE, C.W.; REBELO, M.S. Avaliação da Relação entre Tamanho do Tumor e Características Sociais em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Bucais. Rev. Bras. Cancerol., v. 54, n.2, p.123-129, 2008.

-
- OLIVEIRA, L.R. *et al.* Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira. J. Bras. Patol. Med. Lab., v.42, n.5, p.385-392, 2006.
- OLSHAN, A.F. *et al.* p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v.6, n.7, p.499-504, 1997.
- OPITZ, O.G. *et al.* Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. J. Clin. Invest., v.108, n.5, p.725-732, 2001.
- OSIMITZ, T.G. *et al.* Toxicologic significance of histologic change in the larynx of the rat following inhalation exposure: a critical review. Toxicol. Appl. Pharmacol., v.225, n.3, p.229-237, 2007.
- PAIVA, S.A.R. *et al.* Comportamento de Variáveis Cardíacas em Animais Expostos à Fumaça de Cigarro. Arq. Bras. Cardiol., v.81, n.3, p.221-224, 2003.
- PARKIN, D.M. *et al.* Cancer incidence in five continents. Volume VIII. Lyon: IARC Press, 2002. p.1-781. (IARC Sci. Publ., n.155).
- PELTONEN, J.K. *et al.* p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. Head Neck Oncol., v.2, p.36, 2010.
- PERUSSI, M.R. *et al.* Carcinoma Epidermoide da Boca em idosos de São Paulo. Rev. Assoc. Med. Bras., v.48, n.4, p.341-344, 2002.
- PETITJEAN, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat., v.28, n.6, p.622-629, 2007.
- PIATTELLI, A. *et al.* Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. J. Oral Maxillofac. Surg., v.60, n.5, p.532-540, 2002.
-

-
- RITTA, M. *et al.* Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression. Head Neck, v.31, n.3, p.318-327, 2009.
- ROTHMAN, K.; KELLER, A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. J. Chronic Dis., v.25, n.12, p.711-716, 1972.
- SALLEY, J.J. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. J. Dent. Res., v.36, n.1, p.48-55, 1957.
- SARTOR, S.G. *et al.* Riscos ocupacionais para o câncer de laringe: um estudo caso-controle. Cad. Saúde Pública, v.23, n.6, p.1473-1481, 2007.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell Physiol., v.182, n.3, p.311-322, 2000.
- SILVEIRA, E.J.D. *et al.* Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. J. Bras. Patol. Med. Lab., v.45, n.3, p.233-238, 2009.
- SIMANI, A.S. *et al.* Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. Lab. Invest., v.31, n.1, p.75-81, 1974.
- ST GUILY, J.L. *et al.* Head and neck cancers in France: an analysis of the hospital medical information system (PMSI) database. Head Neck Oncol., v.2, p.22, 2007.
- STEFFEN, N.; MAAHS, G. S. Câncer de laringe, In: Otorrinolaringologia: princípios e prática. Porto Alegre: Artmed, 2006, p.983-996.
- TANDON, S. *et al.* A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v.19, n.2, p.574-587, 2010.
- VAIRAKTARIS, E. *et al.* The hamster model of sequential oral oncogenesis. Oral Oncol., v.44, n.4, p.315-324, 2008.
-

VALENCA, S.S.; DE SOUZA DA FONSECA, A., *et al.* Lung morphometry and MMP-12 expression in rats treated with intraperitoneal nicotine. Exp Toxicol Pathol, v.55, n.5, Mar, p.393-400. 2004.

VAN DER WAAL, I. *et al.* Oral leukoplakia: a clinicopathological review. Oral Oncol., v.33, n.5, p.291-301, 1997.

VENTURI, B.R.M. *et al.* Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. Rev. Bras. Otorrinolaringol., v.70, n.5, p.679-686, 2004.

WALKER, D. *et al.* Inhalation toxicity studies on cigarette smoke (VII). 6-week comparative experiments using modified flue-cured cigarettes: histopathology of the conducting airways. Toxicology, v.10, n.3, p.241-259, 1978.

WANG, X.D. *et al.* Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. J. Natl. Cancer Inst., v.91, n.1, p.60-66, 1999.

WARNAKULASURIYA, S. *et al.* Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J. Oral Pathol. Med., v.36, n.10, p.575-580, 2007.

WELLER, M.D. *et al.* The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. Clin. Otolaryngol., v.35, n.5, p.364-372, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: the MPOWER package. Geneva: WHO, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments. Geneva: WHO, 2009.136p.

WRIGHT, M.E. *et al.* Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on upper aerodigestive tract cancers in a large, randomized controlled trial. Cancer, v.109, n.5, p.891-898, 2007.

WU, C.H. *et al.* Immunohistochemical detection of apoptotic proteins, p53/Bax and JNK/FasL cascade, in the lung of rats exposed to cigarette smoke. Arch. Toxicol., v.80, n.6, p.328-336, 2006.

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. Oral Oncol., v.38, n.8, p.737-746, 2002.

ZIDAR, N. *et al.* Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. J. Laryngol. Otol., v.110, n.5, p.440-445, 1996.

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 12 de fevereiro de 2.009

OF. 003/2009-CEEA

Ilustríssima Senhora

Profª Drª Regina Helena Garcia Martins

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia e CCP

Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Drª Regina,

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

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

Sub-Projeto II: Avaliação dos efeitos nocivos do tabagismo e do etilismo crônico sobre a mucosa laríngea de ratos. Estudo morfológico e imunohistoquímico da imunoexpressão da Proteína p53 e do Ki-67" - Autor: Graziela de Oliveira Semenzati - Orientador: Profª Drª Regina Helena Garcia Martins (aprovado pela CEEA em 12/02/09- Protocolo 698-2008-B)

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA.