

ANDRÉ DESTÉFANI MONTEIRO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES PELA IMPREGNAÇÃO PELA PRATA (AgNOR) NA EVOLUÇÃO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE (CE) QUIMICAMENTE INDUZIDO POR 9,10-DIMETIL-1,2-BENZANTRACENO (DMBA) EM LÍNGUA DE HAMSTERES SÍRIOS DOURADOS (*Mesocricetus auratus*)

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

ANDRÉ DESTÉFANI MONTEIRO

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ASPECTOS
CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E DAS REGIÕES
ORGANIZADORAS NUCLEOLARES PELA IMPREGNAÇÃO
PELA PRATA (AgNOR) NA EVOLUÇÃO DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE (CE) QUIMICAMENTE INDUZIDO POR 9,10-
DIMETIL-1,2-BENZANTRACENO (DMBA) EM LÍNGUA DE
HAMSTERES SÍRIOS DOURADOS (*Mesocricetus auratus*)**

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

Orientador Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral

**São José dos Campos
2004**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E.A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico**. São José dos Campos:FOSJC/UNESP, 2002. 82p.

MONTEIRO, A.D. **Estudo comparativo entre os aspectos clínicos, histopatológicos e das regiões organizadoras nucleolares pela impregnação pela prata (AgNOR) na evolução do carcinoma epidermóide (CE) quimicamente induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em língua de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*)**. 2004. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2004.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Dionísio** e **Rosa**, pela minha formação pessoal e pelo exemplo de perseverança e dignidade.

Aos meus irmãos, **Renan** e **Róger**, pela amizade e união que nossos pais nos ensinaram a ter.

À **Bruna**, meu amor, que mesmo com minha ausência, me ajudou de maneira incalculável com seu apoio, amor e incentivo.

Cada ser, cada coisa, cada partícula,
não tem um, nem dois, nem três destinos, mas vários!
Não existe um caminho rígido, mas várias estradas possíveis e
é aqui que entra o livre arbítrio de cada um.
Deus criou o mundo, criou a vida e todos os seres e para cada um,
traçou vários destinos e somos nós quem escolhemos.
Que Deus Pai Supremo, Ilumine a nossa mente e nos ajude a escolher a
melhor estrada para a nossa evolução até Ele.

Vanda (Usina de Letras)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Adj. LUIZ ANTONIO GUIMARÃES CABRAL**, pela oportunidade em trabalhar sob sua orientação, e por todas as experiências advindas deste convívio.

À Profa. **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**
pela dedicação extraordinária durante a análise histopatológica,
oportunidades concedidas e pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Villela Santos Jr.**, Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela oportunidade da realização deste curso;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal: **Yasmin, Rosilene, Luis, Adriana, Mônica, Olavo, Cristiane e Horácio** por todos os conhecimentos transmitidos e pela oportunidade concedida;

Aos Professores da Disciplina de Semiologia, **Janete e Ana Sueli**, pela oportunidade de convívio;

Aos Professores **Arthur Abburad de Carvalhosa e Paulo Henrique de Souza Castro**, que fazem parte de uma equipe unida e determinada, e por terem estimulado esta fase de minha carreira;

Aos amigos **Fernando e Dácio**, pelo apoio e amizade;

Aos colegas de Pós-Graduação: **Elaine, Fernanda, Andressa, Ângela, Fernando, Lúcia, Suzana, Vanessa e Adriana**, pelo agradável convívio durante este curso;

Às secretárias da Pós-Graduação, **Rosemary de Fátima Salgado, Erena Mischie Hafegawa e Maria Aparecida Conciglio de Souza**, pelo auxílio prestado durante este curso;

À secretária do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, **Silvia Scapel**, por sua contínua disposição para ajudar;

À Sra. **Ângela de Brito Bellini**, Bibliotecária-chefe, pelo valioso auxílio com o material bibliográfico;

Aos meus avós, **Castilho e Beth**, que nunca hesitaram em me ajudar nos momentos que precisei;

Aos técnicos do laboratório de patologia, **Maria Salete Faria e Walter Cruz**, pelo empenho no processamento do material.

À **Capes** pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
RESUMO	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Carcinoma epidermóide.....	25
2.2 Carcinogênese	36
2.2.1 Iniciação	37
2.2.2 Promoção	37
2.2.3 Progressão	38
2.3 Carcinogênese química	39
2.4 AgNOR	42
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODO	44
4.1 Material	44
4.1.1 Amostragem	44
4.1.2 Distribuição	44
4.1.3 Preparação	45
4.2 Método	45
4.2.1 Aplicação	45
4.2.2 Identificação dos animais	46
4.2.3 Eutanásia dos animais, obtenção e preparação do material biológico.....	47
4.2.4 Análise dos aspectos clínicos	47
4.2.5 Análise microscópica	48

5 RESULTADOS	51
5.1 Grupo controle.....	51
5.1.1 Aspecto clínico.....	51
5.1.2 Aspecto histopatológico.....	51
5.1.3 Aspecto da AgNOR.....	52
5.2 Grupo estudo	52
5.2.1 Primeiro sacrifício ou quarta semana	52
5.2.1.1 Aspecto clínico	52
5.2.1.2 Aspecto histopatológico	53
5.2.1.3 Aspecto da AgNOR	54
5.2.2 Segundo sacrifício ou sexta semana	54
5.2.2.1 Aspecto clínico	54
5.2.2.2 Aspecto histopatológico	55
5.2.2.3 Aspecto da AgNOR	56
5.2.3 Terceiro sacrifício ou oitava semana	56
5.2.3.1 Aspecto clínico	56
5.2.3.2 Aspecto histopatológico	57
5.2.3.3 Aspecto da AgNOR	58
5.2.4 Quarto sacrifício ou décima semana	58
5.2.4.1 Aspecto clínico	58
5.2.4.2 Aspecto histopatológico	59
5.2.4.3 Aspecto da AgNOR	60
5.2.5 Quinto sacrifício ou 12 ^a semana	61
5.2.5.1 Aspecto clínico	61
5.2.5.2 Aspecto histopatológico	61
5.2.5.3 Aspecto da AgNOR	62
5.2.6 Sexto sacrifício ou 14 ^a semana	63
5.2.6.1 Aspecto clínico	63
5.2.6.2 Aspecto histopatológico	63
5.2.6.3 Aspecto da AgNOR	65
5.2.7 Sétimo sacrifício ou 16 ^a semana	65

5.2.7.1 Aspecto clínico	65
5.2.7.2 Aspecto histopatológico	65
5.2.7.3 Aspecto da AgNOR	67
5.2.8 Oitavo sacrifício ou 18 ^a semana	67
5.2.8.1 Aspecto clínico	67
5.2.8.2 Aspecto histopatológico	68
5.2.8.3 Aspecto da AgNOR	69
5.2.9 Nono sacrifício ou vigésima semana	70
5.2.9.1 Aspecto clínico	70
5.2.9.2 Aspecto histopatológico	70
5.2.9.3 Aspecto da AgNOR	72
5.2.10 Décimo sacrifício ou 22 ^a semana	72
5.2.10.1 Aspecto clínico	72
5.2.10.2 Aspecto histopatológico	72
5.2.10.3 Aspecto da AgNOR	74
5.2.11 11 ^o sacrifício ou 24 ^a semana.....	74
5.2.11.1 Aspecto clínico	74
5.2.11.2 Aspecto histopatológico	74
5.2.11.3 Aspecto da AgNOR	76
5.3 Síntese dos resultados	76
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO	99
8 REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	114
<i>ABSTRACT</i>	115

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Procedimento de transfixação do fio de silicone em A,B e C 47
- FIGURA 2 - Achados histopatológicos do primeiro sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; acant: acantose; exo: exocitose; pleom: pleomorfismo celular; hc: hiperchromatismo; aum. N: aumento do volume nuclear; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal 54
- FIGURA 3 - Achados histopatológicos do segundo sacrifício. hq: hiperqueratinização; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; hc: hiperchromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; q. ind: queratinização individual; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal 56
- FIGURA 4 - Achados histopatológicos do terceiro sacrifício hq: hiperqueratinização; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; exo: exocitose; hc: hiperchromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; aum. N: aumento do volume nuclear; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual..... 58

FIGURA 5 - Achados histopatológicos do quarto sacrifício hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; hc: hiper Cromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas..... 60

FIGURA 6 - Achados histopatológicos do quinto sacrifício. a: área desqueratinizada; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas..... 62

FIGURA 7 - Achados histopatológicos do sexto sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia

dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas 64

FIGURA 8 - Achados histopatológicos do sétimo sacrifício. Achados histopatológicos do sétimo sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas..... 66

FIGURA 9 - Achados histopatológicos do oitavo sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia

epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolos: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas 69

FIGURA 10 - Achados histopatológicos do nono sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas 71

FIGURA 11 - Achados histopatológicos do décimo sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial

exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas 73

FIGURA 12 - Achados histopatológicos do décimo primeiro sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas..... 75

FIGURA 13 - Aspectos clínicos apresentados no grupo estudo por

sacrifícios..... 80

FIGURA 14 - Aspectos clínicos. A: animal do grupo controle. Epitélio com aspecto liso, brilhante e avermelhado (seta). B: animal do 1º sacrifício. Observar a perda da translucidez do epitélio, apresentando-se mais esbranquiçado, áspero e com perda do brilho (seta). C: animal do 2º sacrifício que apresentou pápula no epitélio de transição do bordo lateral da língua e assoalho bucal (seta). D: animal do 3º sacrifício apresentando áreas eritematosas de permeio a áreas esbranquiçadas (destaque). E: animal do 4º sacrifício apresentando nódulo pequeno com pontos eritematosos na superfície e um epitélio esbranquiçado adjacente à lesão, brilhante e liso. Notar a relação da lesão com o dente molar inferior (destaque). F: outro animal do 4º sacrifício, observar o epitélio esbranquiçado, brilhante e liso (destaque)..... 81

FIGURA 15 - Aspectos Clínicos. A: animal do 5º sacrifício apresentando lesão papilomatosa com superfície eritroleucoplásica (seta), que mantinha relação com o dente molar quando não tracionada pela pinça. B: animal do 7º sacrifício, à semelhança dos animais do 6º sacrifício, apresentou áreas esbranquiçadas entremeadas por áreas eritematosas. Notar (seta) lesão papilomatosa discreta com superfície eritroplásica. C: animal do 8º sacrifício apresentando lesões papilomatosas com superfície eritroleucoplásica (seta). D: animal do 9º sacrifício apresentando lesão nodular com superfície eritroleucoplásica. E: animal do 10º sacrifício

apresentando lesão nodular (seta) e extensa placa no epitélio do bordo lateral e assoalho bucal, ambos com superfície eritroleucoplásica. F: animal do 11º sacrifício apresentando epitélio esbranquiçado contendo pápulas com áreas e pontos eritematosos na superfície..... 82

FIGURA 16 - HE - A: (aumento original de 100X) epitélio de animal do grupo controle exibindo espessura normal da mucosa na região de bordo lateral da língua. (*) destaque do aumento da espessura da lamina própria na região de transição do bordo lingual e assoalho bucal. B: (aumento original de 400X) detalhe do epitélio delgado com cones epiteliais retificados revestido por ortoqueratina (seta). Em destaque (**) proximidade da camada muscular ao epitélio. Notar áreas focais de duplicação da camada basal, com discreto hiperchromatismo. 83

FIGURA 17 - HE – A: (aumento original de 200X) epitélio com grau leve de atipia, mostrando detalhe da lamina própria adjacente apresentando infiltrado inflamatório intenso. B: (aumento original de 400X) aumento do campo anterior com destaque para a exocitose (seta). Notar a presença de hiperchromatismo celular e duplicação acentuada das células da camada basal em epitélio acantótico. C: (aumento original de 200X) expressão da hiperortoqueratose (seta) e acantose (*). D: (aumento original de 400X) em destaque pérola córnea presente em epitélio hiperplásico ortoqueratinizado. E: (aumento aproximado de 15X) exemplo de crescimento epitelial exofítico com aspecto nodular não invasivo.

F: (aumento aproximado de 20X) detalhe de lesão nodular com aspecto infiltrativo..... 84

FIGURA 18 - HE – A: (aumento original de 630X) destaque de fenda intraepitelial acantolítica com células exibindo queratinização precoce. B: (aumento original de 630X) menor expressão de acantólise revestida por paraqueratina. C: (aumento original de 100X) destaque para infiltração neoplásica na camada muscular (seta). D: (aumento original de 200X) ilhas epiteliais neoplásicas em estroma pouco celularizado em carcinoma bem diferenciado. Presença de perolas córneas nas ilhas epiteliais (setas). E: (aumento original de 100X) detalhe de área necrótica na superfície da neoplasia (seta superior) e perola córnea expressiva (seta inferior). F: (aumento original de 100X) áreas focais heterogênicas de diferenciação no mesmo campo..... 85

FIGURA 19 - HE – A: (aumento original de 100X) exemplo de carcinoma superficialmente invasivo com projeção em gota dos cones epiteliais (setas). Alternância entre hiperortoqueratose e hiperparaqueratose no revestimento epitelial. B: (aumento original de 400X) maior aumento da região com hiperparaqueratose. C: (aumento original de 400X) destaque de atrofia epitelial com perda de polaridade e hiperchromatismo das células da camada basal (seta). D: (aumento original de 400X) duplicação expressiva das células da camada basal (área circundada) com célula com aumento do volume nuclear (seta). E: (aumento original de 100X) alternância de porções hiperplásicas e atróficas do epitélio de revestimento

(setas). F: (aumento original de 200X) detalhe de área atrófica (seta) com ausência de queratinização (desqueratinizada).....

86

FIGURA 20 - HE – A: (aumento original de 400X) exemplo de carcinoma *in situ* com extenso pleomorfismo celular. B: (aumento original de 200X) migração de célula neoplásica em direção ao vaso sanguíneo (seta escura) C: (aumento original de 200X) perla córnea cercada por células inflamatórias. D: (aumento original de 630X) destaque de área com microabscesso (área circundada). E: (aumento original de 100X) área desqueratinizada (seta) sobre epitélio ricamente vascularizado (seta escura). F: (aumento original de 400X) foco de necrose e perda de coesão em ilhota neoplásica (seta escura). Presença de queratinização individual de células em destaque (seta clara).....

87

FIGURA 21 - HE – A: (aumento original de 630X) detalhe de padrão neoplásico com invasão extensa e profunda com dissociação de fibras musculares (seta). Em destaque vaso sanguíneo adjacente as células neoplásicas. B: (aumento original de 1000X) maior aumento do campo anterior com destaque a presença de figuras atípica de mitose.....

88

FIGURA 22 - AgNOR – A: (aumento original de 630X) grupo controle, NORs em padrão interfásico. B: (aumento original de 1000X) marcação das NORs em padrão mitótico.....

89

FIGURA 23 - média das NORs por período de sacrifício. Notar que a média torna-se superior a três a partir do oitavo sacrifício ou 18ª semana de aplicação do DMBA.....

90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT = Associação Brasileira de Normas e Técnicas

AgNOR = do inglês “Argyrophilic Nucleolar Organizer Region”, nome dado
à técnica de impregnação das NORs pela prata

acant = acantose;

aum. Mit= aumento de figuras mitóticas;

aum. N = aumento do volume nuclear;

CE = carcinoma epidermóide

cresc = crescimento epitelial exofítico;

DMBA = dimetil-1,2-benzentracento

DNA = do inglês “Desoxyribonucleic acid”, traduzido ácido
desoxirribonucléico

dup. B = duplicação das células da camada basal;

EC = estadiamento clínico

esp = espongiose;

exo = exocitose;

hc = hiper Cromatismo celular;

HE = Hematoxilina e Eosina

hiperp= hiperplasia dos cones epiteliais;

hq = hiperqueratinização;

INCA = Instituto Nacional do Câncer

microabc = microabscesso;

mit. Atip= mitoses atípicas.

NORs = do inglês “Nuclear Organizer Regions”, traduzido com regiões
organizadoras nucleolares

nucléolo = nucléolos aumentados;

P53 = fosfoproteína nuclear

PAHs = do inglês "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", traduzido como
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromaticos

PAS = do ingles "Periodic Acid Schiff"

perd. Coe= perda da coesão celular;

perd. Estr= perda da estratificação epitelial;

proj. gota= projeção em gota dos cones epiteliais;

pleom= pleomorfismo celular;

p. pol = perda da polaridade das células da camada basal;

q. ind= queratinização individual;

RNA = do inglês "Ribonucleic Acid" , traduzido como ácido ribonucleico

TNM = T= lesão primária, N=linfonodo regional e M=metástase à distância
(tumor-node-metastasis)

UICC = União internacional contra o Câncer (Union Internationale contre
cancer)

MONTEIRO, A.D. **Estudo comparativo entre os aspectos clínicos, histopatológicos e das regiões organizadoras nucleolares pela impregnação pela prata (AgNOR) na evolução do carcinoma epidermóide (CE) quimicamente induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em língua de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*).** 2004. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2004.

RESUMO

Neste trabalho foram estudados, comparativamente, os aspectos clínicos, histológicos e das regiões organizadoras nucleolares pela impregnação por prata (AgNOR) na carcinogênese quimicamente induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) a 0,5% diluído em acetona em bordo lingual de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*). Oitenta e oito hamsteres foram divididos em dois grupos: 55 no grupo estudo, pincelados três vezes por semana com a solução de DMBA e 33 no grupo controle, pincelados três vezes por semana apenas com acetona. Os resultados permitiram as seguintes conclusões: os aspectos clínicos da evolução do carcinoma epidermóide (CE) quimicamente induzido pelo DMBA em bordo lingual de hamsteres, guardam semelhança com aqueles contidos na literatura sobre o desenvolvimento do CE em humanos; existe sintonia dos aspectos clínicos com os aspectos histológicos quando comparados à carcinogênese em humanos; a AgNOR mostrou sincronismo com as alterações histológicas de malignidade, mostrando-se um marcador de proliferação celular e, finalmente, o posicionamento do molar inferior do hamster pode ser considerado como coadjuvante da carcinogênese quimicamente induzida em bordo lingual.

PALAVRAS-CHAVES: 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, DMBA; Impregnação pela prata, AgNOR; carcinoma de células escamosas, boca; carcinoma, induzido quimicamente.

1 INTRODUÇÃO

O câncer no Brasil, à semelhança da maioria dos países, é um problema de saúde pública, e encontra-se entre as duas primeiras causas de óbito na maioria das regiões do país. O perfil epidemiológico desta doença tem se alterado nos últimos anos, projetando um aumento na taxa de mortalidade. A neoplasia maligna mais prevalente na boca é o carcinoma epidermóide (CE), perfazendo de 90% a 96% de todos os neoplasmas malignos desta região.

As estruturas de revestimento da boca, pela sua característica anátomo-fisiológica, está intimamente relacionada a vários agentes agressores (biológicos, físicos, químicos) que predisõem a variadas lesões, de ordem local, entre elas as de cunho neoplásico.

Dentre as regiões anatômicas intrabucais, a língua é o local de maior incidência dos CE. Essas lesões caracterizam-se por grande morbidade, pois aproximadamente 90% dos casos diagnosticados estão em fases avançadas, com reduzidas chances de cura ou com expressivas seqüelas decorrentes da terapêutica (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988).

A lesão inicial do CE de boca, de modo geral, é representada por lesões ulceradas, podendo estas serem precedidas por lesões consideradas pré-malignas, como a leucoplasia e a eritroplasia. Estas alterações na mucosa de revestimento são relativamente de fácil visualização ao exame clínico. Destarte, as causas do diagnóstico tardio podem estar relacionadas ao despreparo dos profissionais da classe odontológica e médica, sem formação específica para realizar o diagnóstico nas fases precoces e/ou à desinformação da população

(ONIZAWA et al.⁶⁵, 2003). Situações estas que se tornam mais delicadas em nosso país, devido à falta de atenção e/ou recursos para o diagnóstico de lesões iniciais na rede pública de saúde.

O prognóstico de pacientes portadores de CE de boca depende de uma série de fatores, principalmente o diagnóstico precoce e terapêuticas adequadas, podendo melhorar a qualidade de vida por minimizar tratamentos debilitantes e extensos (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; TOMMASI⁸⁷, 2002)

O CE tem merecido o interesse de vários autores, com trabalhos de cunho epidemiológico, estudos histoquímicos, imunohistoquímico, imunofluorescência, através de cultivos celulares e na carcinogênese experimental em animais de laboratório (BALASUBRAMANIAN et al.⁴, 1995, citado por CHEN et al.²¹, 1998; KITAKAWA⁴⁵, 2002).

Modelos experimentais na carcinogênese química bucal em animais foram propostos, primeiramente por Salley⁷⁶ em 1954, padronizado por Morris⁵⁸ em 1961. Desde então, muitos outros trabalhos foram desenvolvidos visando uma melhor compreensão da carcinogênese, bem como dos fatores etiológicos, prognósticos e de tratamento envolvidos no carcinoma epidermóide de boca (FASSONI et al.³³, 1993; LIMA⁴⁸, 1999; KITAKAWA⁴⁵, 2003).

Um exame clínico minucioso e detalhado; afastar os fatores carcinogênicos; reconhecer e tratar as lesões pré-malignas; bem como ter conhecimento dos exames complementares para o diagnóstico das neoplasias malignas, constituem o principal papel da odontologia na área da oncologia. Pois, desta maneira, tem-se a oportunidade do diagnóstico precoce do câncer da boca, detectando-o em estágios incipientes.

Isto posto, este trabalho objetivou avaliar as alterações clínicas e histopatológicas condizentes com a evolução da carcinogênese em língua do hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) quimicamente

induzidas pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), atendo-se ao paralelismo entre os aspectos clínicos e os achados histopatológicos, e assim, averiguar a possível correlação dos aspectos clínicos e histológicos vistos na carcinogênese em hamsteres e os da carcinogênese humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide

O carcinoma epidermóide (CE), também chamado de carcinoma espino-celular ou de carcinoma de células escamosas, é a neoplasia maligna mais freqüente que ocorre nas estruturas do complexo maxilomandibular, perfazendo de 90 a 96% de todos os neoplasmas malignos da região. Devendo ser considerado que o CE nas estruturas de revestimento bucal apresenta prognóstico bastante desfavorável. Atualmente a melhor opção no combate ao mesmo é a detecção precoce seguida por adequado tratamento (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; PARISI JUNIOR⁶⁶, 2000; TOMMASI⁸⁷, 2002).

Clinicamente, no seu estágio inicial, o CE pode aparecer como lesões aparentemente inofensivas, via de regra, representadas por leucoplasias e/ou eritroplasia, freqüentemente assintomáticas. Esta natureza silenciosa acaba fazendo o paciente postergar a procura por um profissional, propiciando, assim, devido a natureza do processo, invasão local e a ocorrência de metástases (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; PRINCE & BAILEY⁷⁰, 1999; TOMMASI & GARRAFA⁸⁸, 1980; TOMMASI⁸⁷, 2002).

Dib et al.²⁹ (1990) estudaram 4527 casos de CE de boca atendidos no Hospital A.C.Camargo no período de 1953 a 1980, encontrando que 20,8% dos casos eram de localização na língua, constituindo-se a primeira região intrabucal em termos de incidência da lesão. Observaram que apenas 14% dos casos haviam sido diagnosticados no estágio clínico (EC) I, isto é, lesão primária menor que

2cm e ausência de metástases linfonodais ou em outras estruturas, e que 49,1% dos pacientes já apresentavam doença metastática regional ao primeiro exame. A sobrevida em cinco anos nos casos EC I foi de 84%, sendo de 33,4% nos casos acima do EC I.

Dentre as neoplasias malignas o câncer bucal está entre a quinta e oitava posição em termos de incidência, sendo o terceiro em homens e o sétimo em mulheres. Acomete todos os grupos étnicos, variando de uma região geográfica para outra, decorrente dos aspectos sócio-econômicos, bem como dos hábitos e fatores genéticos das populações (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; JOVANOVIC et al.⁴³, 1993; FRANCO et al.³⁶, 1989; BRASIL¹⁵, 1996).

Sankaranarayanan⁷⁸ (1990) publicou estudo epidemiológico sobre o câncer bucal na Índia, relatando que é a primeira localização anatômica em termos de incidência nos homens (12% de todas as neoplasias) e a terceira nas mulheres (8% das neoplasias malignas). O autor relata que a utilização de betel e hábitos relacionados ao tabaco já foram bem descritos na literatura; no entanto há a necessidade de novos estudos sobre a participação do álcool, dieta e higiene oral na carcinogênese. O pico de incidência na Índia é na sexta década de vida, uma década antes do que nos países ocidentais e a proporção entre homens e mulheres é de 2:1. O diagnóstico nos estágios iniciais ocorre somente entre 10 a 15% dos casos, sendo a radioterapia a forma de tratamento mais utilizada em muitas partes da Índia, principalmente porque o tratamento cirúrgico é rejeitado pelos pacientes em função da mutilação e deformidades advindas do mesmo. O câncer oral não é uma prioridade nos departamentos cirúrgicos dos hospitais da Índia, em função de um vasto número de doenças competitivas que requerem cirurgia emergencial.

À semelhança dos dados encontrados na literatura internacional, entre nós a ocorrência do CE aumenta com a idade, tendo

um pico maior na sexta década (TOMMASI & GARRAFA⁸⁸, 1980; ARAÚJO & ARAÚJO², 1984; CRUZ et al.²⁶, 1996).

Fortes evidências epidemiológicas e experimentais relacionam o desenvolvimento do CE em boca à exposição a vários carcinógenos externos. Agentes físicos, químicos e biológicos lesam o ácido desoxirribonucléico nuclear (*desoxirribonucleic acid* - DNA) produzindo mutações, fraturas cromossômicas e outras alterações do material genético (SCULLY & FIELD⁸¹, 1997 citado por BARROS⁷, 1999; JORDAN & DALEY⁴², 1997; HABER & FEARON⁴⁰, 1998 citado por BARROS⁷, 1999; BOSSO & FROES¹², 2002).

Fatores considerados de risco são bem relatados na literatura e dentre os envolvidos com o CE de boca estão o tabaco, o álcool, as irradiações, vírus e a dieta. O mais importante é a exposição crônica ao tabaco, o qual mostra um papel significante na patogênese do câncer bucal (SCULLY & FIELD⁸¹, 1997 citado por BARROS⁷, 1999).

Nos indivíduos fumantes, visto de regra associado ao etilismo crônico, o risco de câncer bucal aumenta e é diretamente proporcional ao tempo de exposição e a intensidade dos mesmos (SALISBURY⁷⁶, 1997).

O tabaco é usado de diversas formas, considerando-se a diferença básica principal naqueles em que o tabaco é fumado e naqueles na qual o tabaco não é queimado, e sim mantido em contato com a mucosa da boca; sendo o risco relativo de câncer bucal aumentado entre 10 a 15 vezes em fumantes, e 5 vezes naqueles que mascam tabaco. (KERAWALA⁴⁴, 1999).

A fumaça do cigarro é um fator de risco importante na etiologia do câncer bucal já bem estabelecido. A fumaça do tabaco tem um grande número de carcinógenos químicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos como benzantraceno e benzopireno, e nitrosaminas como nitrosonornicotina. Estes carcinógenos têm mostrado serem capazes de induzir alterações genéticas de alguns genes. Dentre os principais

oncogenes estão *H-Ras*, *Cyclin-D1* (*Prad-1*), *C-myc*, *Erb B-1* e a *p53* como gene de supressão tumoral (FIELD et al.³⁴, 1993; JORDAN & DALEY⁴², 1997).

O risco de câncer no Brasil está fortemente relacionado ao tabagismo e ao consumo crônico de bebidas alcoólicas. Devido a um possível efeito loco-específico, tem sido descrito o câncer de assoalho de boca e de língua como fortemente associado aos fumantes. O risco para o aparecimento de câncer bucal foi de 6,3 vezes maior nos fumantes em relação àqueles que jamais fumaram. Fumantes de cigarro sem filtro tem risco de CE de boca maior que aqueles que usam cigarros com filtro, cigarrilhas e cachimbo. Aqueles que param de fumar, o risco de desenvolver CE de boca diminui menos da metade dentro de uma década (FRANCO et al.³⁶, 1989; KERAWALA⁴⁴, 1999).

No homem, dados epidemiológicos apontam a bebida alcoólica como um dos fatores atuantes na carcinogênese, porém não está claro se o aparecimento de câncer bucal ocorre devido ao contato direto do álcool com a mucosa ou se devido às alterações provocadas pelo álcool no fígado (SHKLAR⁸⁵, 1972, BLOT¹⁰, 1992).

A capacidade de reparação de uma população de células foi analisada na presença de álcool etílico, sendo que nas concentrações de 2% ou mais elevadas, houve a inibição do reparo celular do DNA com curta ou longa exposição ao etanol. Os carcinógenos químicos podem induzir a mutações e quebra de cromátides nas células do tecido epitelial, provavelmente a maioria das lesões é removida pelas várias enzimas reparadoras. Quando a bebida alcoólica é consumida o reparo do DNA cessa temporariamente e um número de lesões genéticas continuam a se formar, podendo acumular a carga de mutação (HSU⁴¹, 1992 citado por LIMA⁴⁸, 1999).

O comportamento biológico macro e microscópico da mucosa lingual lateral de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*) foi observado após o contato direto com bebidas alcoólicas de

alto teor (cachaça e uísque). Lima⁴⁷ (1997) concluiu que as bebidas alcoólicas de alto teor não têm potencial carcinogênico iniciador sobre a mucosa bucal, não tendo sido avaliado o potencial promotor e de progressão do mesmo.

O efeito das radiações solares na etiologia do CE é evidenciado pela maior incidência dessa lesão no lábio inferior de indivíduos de olhos claros e tez clara ou avermelhada, que são considerados os mais sensíveis às radiações. Essa lesão é mais comum em trabalhadores de áreas rurais e marinheiros (MILLER & WHITE⁶⁰, 1996).

No que se refere à etiologia viral, o mais implicado é o papiloma vírus humano (HPV). No entanto, sua participação no processo da carcinogênese ainda é bem pouco definida, pois tem sido demonstrado que o HPV ocorre em várias patologias bucais (MILLER & WHITE⁶⁰, 1996; CRUZ et al.²⁶, 1996; VECCHIA et al.⁸⁹, 1997).

As dietas pobres em frutas e verduras podem deixar a mucosa de revestimento bucal mais susceptível à ação de carcinógenos locais (VECCHIA et al.⁸⁹, 1997; REIS et al.⁷², 1997). Observou-se uma diminuição do risco de cancerização entre os pacientes com dieta rica em caroteno e frutas cítricas (FRANCO et al.³⁶, 1989).

A deficiência de vitamina A produz uma queratinização excessiva da pele e membranas mucosas, e tem sido sugerido que as vitaminas A, E, e C desempenhem um papel protetor ou preventivo em relação ao pré-câncer e neoplasias bucais (LUPULESCU⁵³, 1994 citado por LUPULESCU⁵⁴, 1996). Acredita-se que os níveis sanguíneos de retinol e a quantidade de betacaroteno ingerido na dieta sejam inversamente proporcionais ao risco de CE bucal e leucoplasia. Acredita-se que as vitaminas retardam a transformação de células pré-neoplásicas em células neoplásicas por ação direta na proliferação celular, restauração do controle de crescimento dependente de ancoragem e no reparo e dano ao DNA (REIS et al.⁷³, 1997; NEVILLE et al.⁶¹, 1995).

O CE bucal de maneira geral tem três padrões de crescimento: exofíticos, ulcerativos e verrucosos, que, de forma geral, apresentam uma base ampla e endurecida à palpação (ARAÚJO & ARAÚJO², 1984).

O CE de boca pode ser precedido por lesões consideradas pré-malignas as quais podem mimetizar outras formas de doenças aparentemente benignas, observando-se que o contrário também é verdadeiro, algumas lesões benignas podem ser erroneamente confundidas com uma maligna (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; JORDAN & DALEY⁴², 1997).

A lesão pré-maligna mais comum é a leucoplasia (85%), definida como sendo uma placa branca em mucosa, não removida por raspagem, e persiste mesmo removido o possível agente irritante local relacionado. Microscopicamente representada por hiperqueratose e/ou acantose e com as demais alterações histológicas alheias a processos específicos; i.e. líquen plano, nevo branco esponjoso; displasia intraepitelial benigna, etc. (WHO⁹², 1978; SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; JORDAN & DALEY⁴², 1997; PINDBORG⁶⁷, 1997, NEVILLE et al.⁶¹, 1995).

O termo eritroplasia é usado para designar lesões na mucosa bucal de coloração vermelho brilhante, placas aveludadas as quais não podem ser caracterizadas clinicamente e histopatologicamente como sendo devido a nenhuma outra condição (WHO⁹², 1978; NEVILLE et al.⁶¹, 1995; PINDBORG⁶⁷, 1997;).

A leucoplasia pode vir a apresentar atipias, mesmo invasiva, sem nenhuma modificação em sua aparência clínica, mas algumas lesões eventualmente apresentam placas avermelhadas espalhadas, chamadas eritroplasia. Esta lesão com mistura de cores vermelha e branca, chamada de eritroleucoplasia, representa um padrão de leucoplasia particularmente suscetível à transformação maligna (WHO⁹², 1978; NEVILLE et al.⁶¹, 1995).

Microscopicamente estas lesões pré-malignas podem mostrar vários graus de atipia epitelial, variando de uma discreta alteração citológica e arquitetural à evidentes anormalidades pleomórficas celulares e mitoses atípicas, vistas em uma atipia severa, sendo, o aumento do grau de atipia associado ao aumento do risco de transformação maligna. (JORDAN & DALEY⁴², 1997; PINDBORG⁶⁷, 1997).

A apresentação clínica mais comum do CE é a forma ulcerada, cujas características variam de exulcerações, úlceras superficiais a úlceras infiltrativas. Clinicamente, a evolução típica é o aumento da lesão que conseqüentemente destrói os tecidos adjacentes por invasão local, à qual se seguem as metástases para linfonodos regionais, e outros setores, sendo essa a característica fundamental da agressividade deste neoplasma (NEVILLE⁶¹, 1995).

A avaliação do tamanho da lesão, os sítios comprometidos pelas metástases e a graduação histológica de malignidade são os parâmetros mais utilizados para avaliar o prognóstico e o planejamento do tratamento. Da quantificação dos parâmetros clínicos redonda o estadiamento clínico (EC) da doença, usado para definir o seu estágio de desenvolvimento. O EC mais popular é o que avalia o tamanho da neoplasia e invasão de estruturas adjacentes (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e presença de metástase à distancia (M), conhecido como sistema TNM, preconizado pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) da Organização Mundial de Saúde. (RAPIDIS, et al.⁷¹, 1977; NEVILLE⁶¹, 1995; PINTO & CAVALARI⁶⁸, 2002).

PINTO & CAVALARI⁶⁸ (2002) compararam o sistema TNM com um critério não-oficial de classificação, evolução e EC, principalmente relatado na literatura dos EUA. A classificação não-oficial classifica em: doença local, doença regional e doença disseminada. Nesta comparação as classificadas pelo TNM como T1N0M0 eram lesões iniciais, e a restante era considerada avançada. Os autores observaram que enquanto apenas 14% das lesões foram iniciais no TNM (T1N0M0),

50,9% foram consideradas doenças locais no segundo critério, isto porque para este último não importa a extensão da lesão. Resultado este que levaria estas lesões a um mesmo protocolo de tratamento, reduzindo para quase metade a sobrevida em cinco anos dos pacientes que tiveram suas lesões classificadas pelo segundo critério.

Quanto à aplicabilidade ao câncer bucal, o sistema TNM, deve ser questionado em diversos aspectos. As neoplasias que têm até dois centímetros de diâmetro, conforme a localização, a exemplo o pelve lingual, devem ser avançadas e não iniciais como preconiza este sistema. (TOMMASI⁸⁷, 2002). O estudo da oncogênese nos ensina que para uma neoplasia atingir dois centímetros de diâmetro, que é o limite do T1, sabe-se que deverão ocorrer centenas de multiplicações celulares. Estima-se que com esta dimensão deverá ter ao redor de dois bilhões de células. Com esta população, jamais poderia ser considerada como uma lesão inicial (PINTO & CAVALARI⁶⁸, 2002).

Broders¹⁷ (1927) foi um dos pioneiros em relacionar as características histológicas dos carcinomas de lábio com o tipo de tratamento mais adequado, considerando que para neoplasias bem diferenciadas o tratamento de escolha deveria ser cirúrgico e, para neoplasias indiferenciadas, a melhor resposta seria obtida com a radioterapia.

A importância da característica histológica foi novamente ressaltada como indicador de evolução clínica, por Broders¹⁸ (1941), isto de acordo com Anneroth et al.¹ (1987), afirmando que outros fatores, como por exemplo, sexo, idade, tamanho e localização da neoplasia, não eram tão significativos para o prognóstico quanto a diferenciação histológica.

A falta de correlação entre grau de diferenciação e os demais aspectos clínicos para o prognóstico, do método de Broders¹⁸ foi, contudo, criticada por Cade & Lee¹⁹ (1957) e Arthur & Fenner³ (1966) citado por Dib³¹ (1992).

Na graduação histológica do CE de boca, via de regra, existem dois sistemas preferidos pelos patologistas: o descrito por Banóczy & Csiba⁶ (1976), e sistema multifatorial de Anneroth et al.¹, (1987).

Banóczy & Csiba⁶ (1976) consideraram principalmente as alterações celulares presentes no epitélio, a saber: estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, cones interpapilares em forma de gota, aumento das figuras mitóticas, perda da polarização da camada basal, perda da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, nucléolos múltiplos e proeminentes, mitoses atípicas, queratinização individual isoladas e perda da coesão celular; e, da quantificação destes achados decorrem os graus de atipia.

Segundo os autores acima mencionados, a atipia leve corresponde às alterações celulares que se restringem à camada basal do epitélio e, via de regra, não se associa a figuras de mitose. Na moderada, temos alterações celulares que atingem o terço médio do epitélio, enquanto que, na severa as alterações podem alcançar o terço superior e as figuras de mitose, além de freqüentes, são atípicas. Em determinadas ocasiões as alterações pertinentes à atipia severa são de tal expressão que se torna difícil diferenciá-la do carcinoma epidermóide *in situ*. Quando da ruptura da membrana basal, temos então o carcinoma micro ou macro invasivo, que infiltra respectivamente em menor ou maior grau o tecido conjuntivo adjacente.

Anneroth et al.¹ (1987) propuseram um sistema multifatorial de gradação histológica de malignidade, o qual leva em consideração não somente as atipias encontradas na população celular da neoplasia, mas também avaliaram a relação hospedeiro-neoplasia, estimado por parâmetros quanto aos padrões de invasão, estágio de invasão no que diz respeito ao comprometimento da lâmina própria adjacente, da musculatura e de glândulas salivares, bem como a

expressão do infiltrado linfo-plasmocitário, redundando, em graus crescentes de malignidade – respectivamente do grau 1 ao grau 4.

O câncer é causado pelo acúmulo de mutações que ativam os proto-oncogenes ou inativam genes supressores e o resultado passa para células filhas, caracterizando-se como uma impressão digital da neoplasia. É estimado que seis a oito alterações genéticas distintas sejam necessárias para o desenvolvimento da neoplasia. Alguns indivíduos podem herdar defeitos genéticos fazendo deles mais susceptíveis ao câncer, enquanto outros adquirem estas mutações no decorrer de sua vida (BOYLE et al.¹³, 1994; JORDAN & DALEY⁴², 1997).

Chung et al.²² (1993) estudaram fragmentos de neoplasias primárias e secundárias de 31 pacientes, com o objetivo de avaliar alterações na expressão da proteína p53. Os resultados encontrados foram de que em 21 casos houve mutações discordantes da proteína p53 dos espécimes da neoplasia primária e da segunda neoplasia, caracterizando para os autores o fato de que esses eventos ocorrem de maneira independente, reforçando a tese de que o alto risco de segundas neoplasias, em pacientes portadores de neoplasias primárias de cabeça e pescoço, esteja relacionado ao conceito de “cancerização de campo” associado com fatores de risco e não a uma predisposição genética.

Silverman Junior⁸⁶ (1988) e Robbins et al.⁷⁴ (1996) enfatizaram que o prognóstico de pacientes portadores de CE de boca depende de uma série de fatores, principalmente o diagnóstico precoce e terapêuticas adequadas.

Onizawa et al.⁶⁵ (2003) analisaram os fatores que contribuem para o atraso no diagnóstico do CE de boca de 152 pacientes encaminhados para tratamento no Hospital Universitário de Tsukuba, Japão, sendo o tempo médio de 1,6 meses para o atraso causado pelo paciente e de 14 dias para o causado pelo profissional. Os autores sugerem que a educação dos pacientes sobre o câncer bucal e avaliação profissional periódica são medidas necessárias para reduzir o atraso no

diagnóstico causado pelo paciente, e que um contínuo aprimoramento da habilidade em diagnosticar precocemente, em particular, lesões de aspecto inocente ou lesões francamente malignas de pequenas dimensões, é importante para diminuir o atraso atribuído aos profissionais competentes.

Rubright et al.⁷⁵ (1996) realizaram um estudo para identificar os fatores relacionados ao diagnóstico de câncer de boca em estágio avançado, através da análise de 53 pacientes tratados de 1990 a 1994. A distribuição por sexo não foi significativamente associada ao estágio da neoplasia, da mesma forma que o grau de escolaridade, exceto naqueles pacientes com escolaridade menor do que o secundário, em que houve um risco maior de doença avançada. Os resultados mostraram que quando médicos ou dentistas realizaram o diagnóstico, esse foi freqüentemente em fases mais iniciais. Os próprios pacientes procuraram profissionais com alguma queixa em 30% dos casos, sendo 38% das demais notadas por médicos e 32% por dentistas. Em todos os casos descobertos por médicos ou dentistas, apesar da maioria apresentar dor ou algum desconforto, os pacientes não haviam visto a neoplasia. Apenas dois pacientes, ambas enfermeiras, realizavam o auto-exame da boca e 87% dos pacientes não conheciam os sinais de alerta para um câncer de boca. O tempo médio de demora para o diagnóstico, a partir dos primeiros sintomas, foi de 5,3 meses. Poucos pacientes realizavam visitas periódicas ao dentista, sendo mais freqüente procurarem médicos, no entanto esses raramente examinaram a boca.

Entretanto, a evolução clínica da doença pode fugir aos padrões determinados devido à heterogênea população celular e ao comportamento biológico variado de malignidade. Algumas vezes, lesões diagnosticadas em fases bem iniciais apresentam comportamento muito desfavorável e lesões avançadas apresentam curas inesperadas (SCULLY & FIELD⁸¹, 1997 citado por BARROS⁷, 1999; JORDAN & DALLEY⁴², 1997).

Copper et al.²³ (1995) estudaram os parentes de primeiro grau de 105 pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, e compararam com um grupo controle, com a finalidade de se avaliar o risco genético de desenvolver câncer. Os resultados obtidos mostraram um risco 3,5 vezes aumentados no grupo de parentes de pacientes com câncer, sugerindo que, além do fumo e álcool, a predisposição genética também seja um importante fator de risco para o desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.

Wang et al.⁹⁰, 2003; Chen et al.²¹ (1998) avaliaram a técnica da espectroscopia de fluorescência utilizando fibra óptica no modelo de carcinogênese induzidos por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em mucosa da bolsa da bochecha de hamsteres. Concluíram que pode ser uma ferramenta diagnóstica proveitosa para o diagnóstico de pré-cancer e câncer bucal tanto *in vivo* e *in vitro* com uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 95%.

Assim sendo, o Cirurgião Dentista deve estar imbuído de sua responsabilidade como profissional da área de saúde, estando afeito ao reconhecimento dos aspectos condizentes, não só ao CE já instalado, bem como as lesões com efetivo potencial de malignização, detectando o processo em estágio em que o tratamento é efetivo e a morbidade é mínima (KRUTCHKOFF et al.⁴⁶, 1990; DIB^{30,31}, 1991,1997).

O exame citológico e a biópsia, e respectivamente, o conseqüente estudo citopatológico e anatomopatológico são condições necessárias para o diagnóstico do tipo histológico da neoplasia, exames complementares estes que o cirurgião dentista deve utilizar mais (SILVERMAN JUNIOR⁸⁶, 1988; KRUTCHKOFF et al.⁴⁶, 1990; JORDAN & DALLEY⁴², 1997; TOMMASI⁸⁷, 2002).

2.2 Carcinogênese

O processo de carcinogênese, em geral, se dá lentamente, podendo levar vários anos para que as células mutadas proliferem e dêem origem a uma lesão visível, passando este processo por vários estágios. Estudos experimentais consideram três etapas na evolução das neoplasias malignas de modo geral, a saber: iniciação, promoção e progressão (BERENBLUN⁸, 1964 citado por BARROS⁷, 1999; ODUKOYA & SHKLAR⁶³, 1984; FRANKS³⁷, 1990; BRASIL¹⁴, 1996; FASSONI et al.³³, 1993).

2.2.1 Iniciação

É o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinogênicos que provocam modificações irreversíveis em nível do genoma. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar-se alterações clínicas, contudo encontram-se "preparadas", ou seja, "iniciadas" para a ação do agente promotor, aquele pertinente à iniciação, ou outro. No entanto, a célula lesada ou permanece latente, podendo ser eliminada do organismo pelos mecanismos homeostáticos ou passa a desenvolver outras alterações na dependência de novos estímulos (FRANKS³⁷, 1990; BRASIL¹⁴, 1996; ROBBINS et al.⁷⁴, 1996).

2.2.2 Promoção

O estímulo da divisão celular parece ser um componente importante nas células geneticamente alteradas, ou seja, iniciadas, envolvendo a seleção e expansão destas. O material genético das células iniciadas modifica a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. A célula iniciada é transformada em célula

neoplásica, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente promotor, pois a não persistência de agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio, pois seus efeitos podem ser reversíveis por meio de inúmeros mecanismos, como a apoptose e a defesa imunológica.

Esta promoção pode ser causada pelo carcinógeno ou por outras substâncias, denominadas agentes promotores, as quais isoladamente não causam o aparecimento de neoplasias. Substâncias presentes em alimentos, exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de agentes promotores que transformam células iniciadas em neoplásicas (FRANKS³⁷, 1990; ROBBINS et al.⁷⁴, 1996; BRASIL¹⁴, 1996; MAGALHÃES & MAGALHÃES⁵⁵, 2000).

2.2.3 Progressão

É o terceiro, e último, e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado e autônomo, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença, estabelecendo-se assim o fenótipo de malignidade. Ocorre uma perda no controle do crescimento, invasão dos tecidos, metástases e instabilidade genética aumentada (BERENBLUN⁸, 1964 citado por BARROS⁷, 1999; PITOT⁶⁹, 1993; ROBBINS et al.⁷⁴, 1996; BRASIL¹⁴, 1996; MAGALHÃES & MAGALHÃES⁵⁵, 2000).

Os fatores que promovem a iniciação e/ou promoção da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos, que geralmente são substâncias eletrofilicas, atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, como as bases de DNA, assim, acabam se ligando e levando à formação de adultos. Os quais, podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de

tumor, e iniciar o processo de carcinogênese (WILLIAMS⁹³, 2001; LOURO⁵¹, 2002; LOUREIRO et al.⁵⁰, 2002).

Em termos gerais, a evolução da célula normal para a célula neoplásica é caracterizada por alterações na composição dos cromossomos, decorrentes da mutação ou deleção ocorrida nos proto-oncogenes em oncogenes, ou na inativação do gene de supressão neoplásica, os quais são pivôs genéticos durante os estágios de carcinogênese. As atividades normais destes genes estão relacionadas ao controle da divisão, crescimento e diferenciação celular, além do controle da apoptose (BISHOP⁹, 1991; SCULLY & FIELD⁸¹, 1997 citado por BARROS⁷, 1999; HABER & FEARON⁴⁰, 1998 citados por BARROS⁷, 1999; LOURO^{51,52}, 2002).

Entre as substâncias, reconhecidas efetivamente com propriedades de iniciação e de promoção do CE experimental, esta o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), o qual na dose e em tempo de exposição determinados, funcionam como agentes carcinogênicos completos (CHAUDHRY et al.²⁰, 1967 citado por FASSONI et al.³³, 1993; ODUKOYA & SHKLAR⁶²⁻³, 1982 e 1984; WHO⁹¹, 2000).

2.3 Carcinogênese química

Percival Pott (1775) foi o pioneiro em relatar que agentes químicos presentes no meio ambiente podiam causar câncer, observando a alta incidência de câncer de escroto em limpadores de chaminés, os quais tinham um contato prolongado com a fuligem presente nas mesmas. (BRASILEIRO FILHO et al.¹⁶, 1998).

Inicialmente a carcinogênese quimicamente induzida em animais de laboratório foi obtida mais facilmente em pele do que em mucosa bucal (BONNE¹¹, 1925 citado por EVENSON³², 1981).

Somente em 1973, Fujita et al.³⁹, desenvolveram um modelo de carcinogênese quimicamente induzida em língua de hamsteres sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) utilizando DMBA na concentração de 0,5%, em acetona como veículo. Os autores obtiveram 100% de carcinoma epidermóide na língua dos animais, no período de 13 a 25 semanas de aplicações, precedidas por escarificação local.

Mais tarde, Marefat & Shklar⁵⁷ (1977), observaram que não havia necessidade de escarificações prévias às aplicações do DMBA como preconizado por Fujita et al.³⁹ (1973). Obtiveram carcinoma epidermóide na língua em 100% dos animais tratados no período de 12 a 13 semanas de aplicação.

Outras espécies também foram utilizadas, como rato, coelho e macaco, porém grande número dos experimentos não foi bem sucedido, sendo que atualmente o hamster sírio dourado tem sido o animal de escolha (EVENSON³², 1981).

Além do DMBA, outro carcinógeno freqüentemente utilizado tem sido o 4-nitroquilonina-1-óxido (4NQO), este último administrado sistemicamente na água de beber em baixa concentração (0,001%) para indução de alterações clínico-patológicas na mucosa bucal da língua de ratos, porém podem levar até um ano para a manifestação clínica da lesão (DAYAN et al.²⁷, 1997).

Diferentes sítios de aplicação do carcinógeno DMBA em hamster também foram estudados, e a maioria dos autores tem utilizado a bolsa da bochecha (REDMAN et al.⁷², 1992; LIN et al.⁴⁹, 1996; McMILLAN & SMILLIE⁵⁸, 1996; SHEARER et al.⁸³, 1997; SCHWARTZ et al.⁷⁹, 2000).

Contudo, esse modelo tem sido muito discutido, visto que esta estrutura não se encontra presente nos humanos, o epitélio de revestimento nessa região é bastante delgado, sem glândulas salivares, apresentando-se como homeostaticamente favorável ao assentamento do neoplasma; somando-se o fato de que o contato do carcinógeno com a mucosa se dá por um tempo mais longo do que aquele observado na

borda lateral de língua, por isso, caracterizando-se como um modelo não compatível para o compreensão da carcinogênese no homem. (EVENSON³², 1981).

O carcinógeno DMBA pertence à classe dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resultante da queima incompleta de outros carbonetos. Possui a propriedade de formar ligações covalentes com o nitrogênio e o oxigênio das bases nitrogenadas do DNA nuclear, levando a alteração nestas últimas (O'NEILL⁶⁴, 1995; WHO⁹¹, 2000).

O DMBA é largamente encontrado no solo e na atmosfera, tendo como fonte comum os incêndios florestais, erupções vulcânicas, queima de derivados do petróleo (diesel e gasolina), fumaça de cigarros, fábricas de asfalto, frutas e vegetais não lavados e sobre a carne de churrasco (FRANKS & TEICH³⁸, 1990; MANAHAN⁵⁶, 1993; WHO⁹¹, 2000; BOSSO & FROES¹², 2002).

Como já citado anteriormente, o DMBA atua como iniciador e promotor. A iniciação é uma lesão definitiva em um tecido ou grupo de células, que sob a ação subsequente de um promotor, propicia o desenvolvimento CE. Assim, o DMBA age como iniciador e suas aplicações subsequentes promovem a perpetração e proliferação dos clones celulares alterados.

O uso de acetona como veículo do DMBA, comparado com outros veículos empregados em relatos da literatura, como o óleo mineral, a parafina e o polipropilenoglicol, diminui o tempo de latência quanto ao aparecimento de alterações epiteliais na língua dos animais, além de proporcionar uma solução mais homogênea, embora mais volátil do material. Sendo a concentração do DMBA em acetona a 0,5% é considerada a ideal para induzir carcinogênese, pois concentrações menores falham nessa finalidade e concentrações maiores que 1,5% são extremamente tóxicas e acabam por matar os animais de estudo (MAREFAT & SHKLAR⁵⁷, 1977).

2.4 AgNOR

A técnica histoquímica do AgNOR consiste na coloração pela prata das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs). Constitui um recurso para analisar a proliferação celular, uma vez que estas estruturas estão relacionadas com o nível de atividade celular e nuclear. Nas células em proliferação, aumenta o número de NORs, tornando-se possível a relação entre a contagem de NORs e a proliferação celular (CROCKER²⁴, 1996; SCHWINT et al.⁸⁰, 1996).

Na técnica do AgNOR visualizamos as regiões organizadoras nucleolares (NORs), através do emprego do nitrato de prata para coloração das proteínas associadas a essas regiões, as quais representam alças de DNA que possuem os genes para a transcrição de RNA ribossômico, do qual decorre a formação dos ribossomos e, conseqüentemente, a síntese protéica; nesta técnica identificados como pontos enegrecidos nos núcleos, sendo o número e a configuração das NORs relacionados com a atividade nuclear. A atividade proliferativa celular é representada pelo aumento do número de NORs/núcleo, o que reflete seu estágio de mitose. A célula interfásica possui NORs volumosos e agregados ao núcleo. Dessa forma, a observação de células com um a dois NORs/núcleo sugere fortemente que as mesmas estão em interfase. Por outro lado, quando a célula entra em mitose o nucléolo se fragmenta, dando origem a numerosos e pequenos NORs, observados no núcleo. Na célula neoplásica são observados até oito NORs/núcleo. Esta relação número de NORs x atividade mitótica é demonstrada por trabalhos que verificaram correlação positiva entre o aumento do número de NORs e outros parâmetros de avaliação da proliferação celular, como o Ki-67 e o PCNA. Por essa razão a técnica do AgNOR tem sido usada para estimar o comportamento biológico de várias neoplasias; daí carcinomas que apresentavam NORs menores, múltiplos, com morfologia irregular e dispersos pelo núcleo, comportarem-se com maior grau de malignidade.

(CROCKER²⁴, 1996; BARROS⁷, 1999; DERENZINI²⁸, 2000).

A técnica do AgNOR é simples, de fácil interpretação, absorve pouco tempo de trabalho, além de apresentar custos relativamente baixos e pode ser padronizada com relativa facilidade (CROCKER & SKILBECK²⁵, 1987; DERENZINI²⁸, 2000; KITAKAWA⁴⁵, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

Frente ao revisto na literatura propusemo-nos a realizar este trabalho com os seguintes objetivos:

- a) avaliar as alterações clínicas e histopatológicas condizentes com a evolução da carcinogênese em língua do hamster sírio dourado quimicamente induzidas pelo DMBA, atendo-se ao paralelismo entre os aspectos clínicos, achados histopatológicos e histoquímicos (AgNOR);
- b) averiguar a possível correlação dos aspectos clínicos e histológicos vistos na carcinogênese em hamsteres e os da carcinogênese humana relatado na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos foram cuidadosamente executados e previamente autorizados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP-, protocolo número 037/2002-PA/CEP de novembro de 2002 (Anexo A).

4.1 Material

4.1.1 Amostragem

Neste experimento, foram utilizados 88 hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), 22 machos e 66 fêmeas, com peso corporal médio de 100 gramas e com quatro semanas de vida. Mantidos sob as condições ambientais, em salas não-climatizadas, providas de exaustor de ar, onde foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram gentilmente cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP-Botucatu, e alojados no biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP Campus de São José dos Campos.

4.1.2 Distribuição

Os animais foram proporcionalmente divididos em dois grupos, a saber: um o grupo controle, contendo 33 animais (27 fêmeas e 6 machos) e outro o grupo de estudo, com 55 animais (39 fêmeas e 16 machos), totalizando assim 88 hamsteres.

Os animais foram distribuídos em 16 gaiolas, sendo o grupo controle em seis gaiolas (três com cinco hamsteres e três com seis

hamsteres) e o grupo estudo em dez gaiolas (cinco com seis e as outras cinco com cinco animais), observando-se a igualdade de sexo.

4.1.3 Preparação

O carcinógeno 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno – DMBA (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, Wisconsin-USA) foi adquirido na forma de pó (1g), pesado e diluído em 200ml de acetona, obtendo assim uma solução de DMBA a 0,5% em acetona, preparada em câmara de fluxo laminar e armazenada em frascos de vidros de 15ml de cor âmbar e mantidos à temperatura de 4° C.

4.2 Métodos

4.2.1 Aplicação

Utilizamos pincéis pelo de camelo nº 02 para a aplicação da solução de DMBA no bordo lingual esquerdo dos hamsteres três vezes por semana. Foi utilizado, separadamente, um pincel para a aplicação da solução de DMBA e outro para a aplicação de acetona. A superfície da mucosa lingual do bordo esquerdo foi pincelada sete vezes consecutivas, evitando-se o excesso dos mesmos para minimizar a deglutição da droga.

Durante as aplicações foi feita apenas contenção física dos animais, a qual demonstrou ser eficiente, devido ao fato de que, a sedação poderia levar a perda de vários animais por efeitos tóxicos da medicação (KITAKAWA⁴⁵, 2003).

O estudo estendeu-se por 24 semanas, período reconhecido para a iniciação, promoção e progressão do CE em língua de hamster induzido por DMBA (MAREFAT & SHLAR⁵⁷, 1977; KITAKAWA⁴⁵, 2003).

Material de proteção individual (EPI) para os operadores, como dois pares de luvas, gorro, máscaras, avental cirúrgico descartável e óculos de proteção, foi utilizado durante todo o experimento, uma vez ser o DMBA substância altamente cancerígena.

4.2.2 Identificação dos animais*

Os animais foram identificados por tatuagem, utilizando tinta nanquim injetada através de uma seringa de insulina. Fazendo a contenção mecânica, foi aplicada nas patas dianteiras e traseiras dos animais. Essa injeção é subcutânea na região subplantar ou subpalmar somente a quantidade de tinta suficiente para que seja visualizada (aproximadamente 0,05 ml da tinta).

A identificação foi definida pela pata tatuada ou pelo conjunto delas, dependendo do número de animais presentes na gaiola.

Para uma padronização utilizamos a seguinte classificação:

- a) animal 1: tatuagem na pata dianteira direita;
- b) animal 2: tatuagem na pata dianteira esquerda;
- c) animal 3: tatuagem na pata traseira direita;
- d) animal 4: tatuagem na pata traseira esquerda;
- e) animal 5: sem tatuagem;
- f) animal 6: tatuagem na pata dianteira esquerda e na pata traseira esquerda (KITAKAWA⁴⁵, 2003).

* Bolanho, A. (Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Disciplina de Patologia Bucal). Comunicação pessoal, 2003.

4.2.3 Eutanásia dos animais, obtenção e preparação do material biológico

A partir da quarta semana do estudo, na medida em que as lesões tornavam-se visíveis clinicamente, foram selecionados cinco animais do grupo de estudo e três do grupo controle e sacrificados por overdose de sedativos de uso veterinário (Dopalen®* e Rompum®**). Em seqüência as línguas dos respectivos animais foram removidas com bisturi equipado com lâmina nº 15, e fixadas em formaldeído a 10% tamponado em pH 7,2. A partir daí o mesmo procedimento foi levado a cabo quinzenalmente, até que se completou a 24ª semana do experimento. Após a fixação, transfixamos as línguas longitudinalmente um fio de silicone com auxílio de uma agulha, à direita do plano axial mediano, procedimento este visando identificar o lado do corte oposto ao das aplicações do carcinógeno (Figura 1). Todo material foi incluído em blocos de parafina e cortados em fatias com espessura de 5µm.

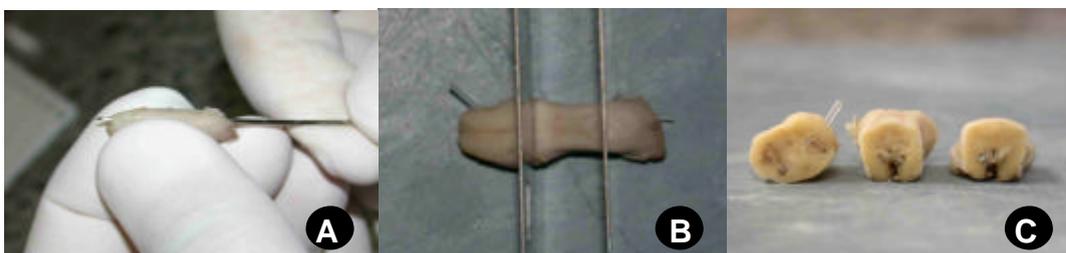


FIGURA 1 – Procedimento de transfixação do fio de silicone em A,B e C.

4.2.4 Análise dos aspectos clínicos

As alterações macroscópicas foram visualmente acompanhadas e seus aspectos devidamente registrados durante todo o experimento. De acordo com seu aspecto foram classificadas como: áreas esbranquiçadas semelhantes à leucoplasia, áreas eritematosas semelhantes à eritroplasia, associação das duas áreas à semelhança de eritroleucoplasia; e de acordo com sua forma e tamanho, como: pápula, placa, papilomatose (projeções papilomatosas) e nódulo.

* Dopalen – Cloridrato de Ketamina – Sespo – Ind. Com. LTDA, saúde animal, Brasil.

** Rompum – Cloridrato de Xilasina 2% - Laboratório Bayer, Saúde Animal, Brasil.

Essas alterações foram documentadas antes do sacrifício por fotografia digital com a câmera Nikon Coolpix 995-3.3 mega pixel, utilizando a configuração de qualidade normal e tamanho SXGA (1280 x 960 pixels).

4.2.5 Análise microscópica

Os cortes foram corados pelos métodos tintoriais da hematoxilina-eosina (HE), do ácido periódico de Schiff (Periodic Acid Schiff – PAS) e da marcação argirofílica para as regiões organizadoras nucleolares (Argyrophilic Nuclear Organizer Regions – AgNOR), posteriormente analisados por três observadores.

A HE é a principal técnica de coloração de tecidos para o estudo de rotina. Através da mesma, podemos diferenciar porções basófilas e acidófilas do tecido estudado. A hematoxilina comporta-se como corante básico, caracterizando-se pela acidofilia, ou seja, tem afinidade por substâncias ácidas; assim sendo cora o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso, locais onde existe grande quantidade de proteínas ácidas. Sendo que a eosina é um corante ácido caracterizando-se pela basofilia, tendo afinidade por proteínas básicas presentes no citoplasma, em outras substâncias básicas citoplasmáticas, bem como pelas fibras colágenas (BANCROFT & STEVENS⁵, 1996).

A membrana basal consiste de muco-proteínas associadas com fibras reticulares (colágeno tipo IV), e está localizada subjacente ao epitélio e adjacente ao endotélio de capilares sangüíneos, podendo estar particularmente pronunciada ao redor de folículos pilosos e túbulos do epidídimo. O primórdio da invasão de um carcinoma epidermóide caracteriza-se por alterações na membrana basal, porém evento como este, em particular, pode ser decorrente apenas de fenômenos inflamatórios e, por outro lado, metástases de neoplasias

podem sintetizar membrana basal (BANCROFT & STEVENS⁵, 1996).

A membrana basal pode ser evidenciada pela técnica do PAS, na qual o ácido periódico oxida os grupamentos 1-2 glicol, produzindo aldeídos. Estes aldeídos reagem com a fucsina descolorada, chamada de reativo de Schiff, dando um composto de adição, magenta e insolúvel. Através dessa técnica é possível visualizar polissacarídeos simples ou associados a proteínas (BANCROFT & STEVENS⁵, 1996).

A análise quantitativa das NORs das células do tecido lingual foi realizada através do uso da objetiva 100X em imersão, em microscópio de luz Axiophot-Axioplan 2 (Carl Zeiss – Germany). Quando as NORs apresentavam sobreposição, ou quando os contornos nucleares eram imprecisos, estas estruturas não eram analisadas. Nos casos onde as NORs exibiam uma proximidade muito acentuada, dificultando sua individualização, eram consideradas como uma estrutura única. Os núcleos que não apresentavam NORs não eram analisados, pois a falta dessa estrutura poderia estar relacionada ao plano de corte do material, estando essas localizadas em um plano acima ou abaixo daquele analisado.

A contagem visual do número das NORs presentes em cada núcleo foi tabulada até se obter a contagem de cem núcleos da área pincelada, ou quando presente, da área correspondente à lesão, sendo posteriormente feita a média.

O material foi depois observado em microscopia de luz por três observadores e os achados histopatológicos foram tabulados segundo critérios de gradação de malignidade (ANNEROTH et al.¹, 1987) associados aos critérios de atipia (BANÓCZY & CSIBA⁶, 1976; WHO⁹², 1978) e correlacionados com os aspectos clínicos nas diferentes etapas do processo de carcinogênese.

5 RESULTADOS

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) apresentaram-se como pontos enegrecidos no interior dos núcleos. Essa marcação podia apresentar basicamente dois padrões: interfásico, cujas NORs faziam-se presentes em número de um a dois por núcleo, com formato arredondado e geralmente de tamanho médio (Figura 22 A); outro padrão observado foi o mitótico, cujas NORs apresentaram-se como estruturas numerosas, pequenas e de formato irregular (Figura 22 B).

5.1 Grupo controle

5.1.1 Aspecto clínico

O aspecto clínico observado no bordo lingual dos hamsteres do grupo controle foi de um epitélio liso, brilhante e avermelhado, e assim perpetuou em todos os animais do grupo controle (Figura 14 A).

5.1.2 Aspecto histopatológico

No primeiro sacrifício dos animais do grupo controle (quatro semanas de aplicação de DMBA) observou-se epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, com lâmina própria composta por estreita faixa de tecido conjuntivo frouxo, pouco celularizado, com pequeno

número de vasos sanguíneos, ausência de infiltrado inflamatório e sinais de malignidade, adjacente à espessa camada de muscular bem vascularizada e inervada. Observaram-se, ainda, porções duplicadas da camada basal, expressando hipercromatismo celular, ora com aspecto de perda de polaridade das células da camada basal (Figura 16 A e B). Foram achados estes constantes em todos sacrifícios subseqüentes do grupo controle.

5.1.3 Aspecto da AgNOR

Em todos os sacrifícios a média da contagem das NORs por núcleo não foi superior a dois, com tamanho médio, forma regular dentro dos padrões interfásicos, não caracterizando aumento da proliferação celular.

5.2 Grupo estudo

5.2.1 Primeiro sacrifício ou quarta semana de aplicação

5.2.1.1 Aspecto clínico

Nos cinco animais (100%) deste grupo, a alteração observada clinicamente foi de uma mucosa levemente esbranquiçada, mais áspera e com perda do brilho, quando comparada com o grupo controle (Figura 14 B). Apesar destas alterações, persistiram em todos

os animais, em maior ou menor graus até a 24^a semana do desenvolvimento do trabalho.

5.2.1.2 Aspecto histopatológico

Neste primeiro grupo a histopatologia revelou hiperortoqueratose nos cinco animais (100%), acantose (Figura 17 C) em um animal (20%) e exocitose (Figura 17 B) em quatro (80%). As atipias observadas restringiam-se às células da camada basal, onde se observou a duplicação das células da mesma (Figura 19 D), presente nos cinco animais do grupo (100%), pleomorfismo celular foi observado em um animal (20% do grupo), hiper cromatismo das células da camada basal (Figura 17 C) estava presente em dois animais (40%), aumento do volume nuclear foi notado em um animal (20%), perda da polaridade de células da camada basal (Figura 19 D) em um (20%), achados estes tabulados na Figura 2.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que um animal apresentou atipia leve, enquanto os demais se encontraram dentro dos padrões de normalidade.

Em todos os animais a lâmina própria apresentou-se como uma estreita faixa de tecido conjuntivo fibroso com a presença de discreto infiltrado inflamatório em um animal (20%), moderado em três (60%) e intenso (Figura 17 B) em um (20%).

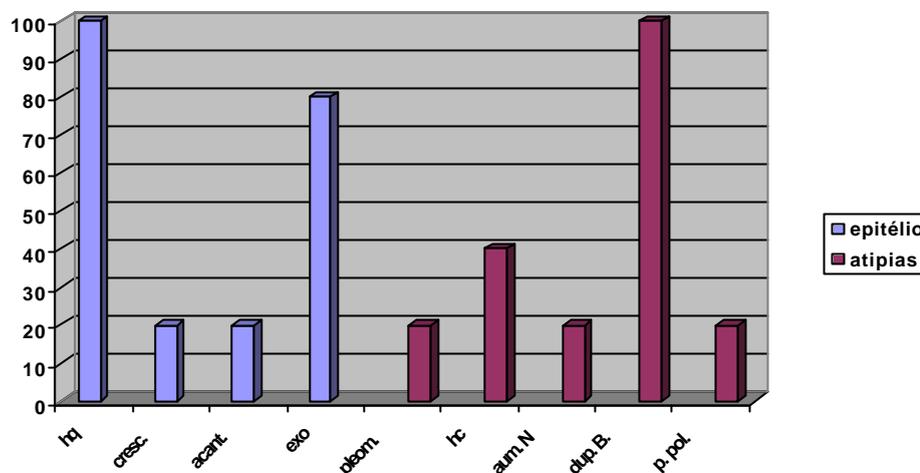


FIGURA 2 – Achados histopatológicos do primeiro sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; acant: acantose; exo: exocitose; pleom: pleomorfismo celular; hc: hiperchromatismo; aum. N: aumento do volume nuclear; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal.

5.2.1.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos não apresentaram alteração de forma, tamanho ou número, com média 1.97 por núcleo.

5.2.2 Segundo sacrifício ou sexta semana de aplicação

5.2.2.1 Aspecto clínico

Neste grupo foi observada maior expressão quanto ao aspecto esbranquiçado, aspereza e perda de brilho do epitélio das demais

áreas, quando comparadas ao grupo anterior e um animal (20%) apresentando pápula (Figura 14 C).

5.2.2.2 Aspecto histopatológico

Neste segundo grupo a histopatologia revelou hiperortoqueratose nos cinco animais (100%), acantose em três animais (60%), hiperplasia dos cones epiteliais (Figura 19 E) em dois (40%), exocitose em dois (40%) e espongiose em um animal (20 %). As atipias observadas restringiam-se às células da camada basal, onde foi notada duplicação das células da camada basal nos cinco animais do grupo (100%), perda da polaridade das mesmas, em quatro animais (80%) e hiperchromatismo celular, em um animal (20%). Queratinização individual de células da camada basal foi observada em dois animais (40%), achados estes tabulados na Figura 3.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que um animal (20%) apresentou atipia leve. Em todos os animais a lâmina própria apresentou-se como uma estreita faixa de tecido conjuntivo fibroso com a presença de discreto infiltrado inflamatório em quatro animais (80% do grupo).

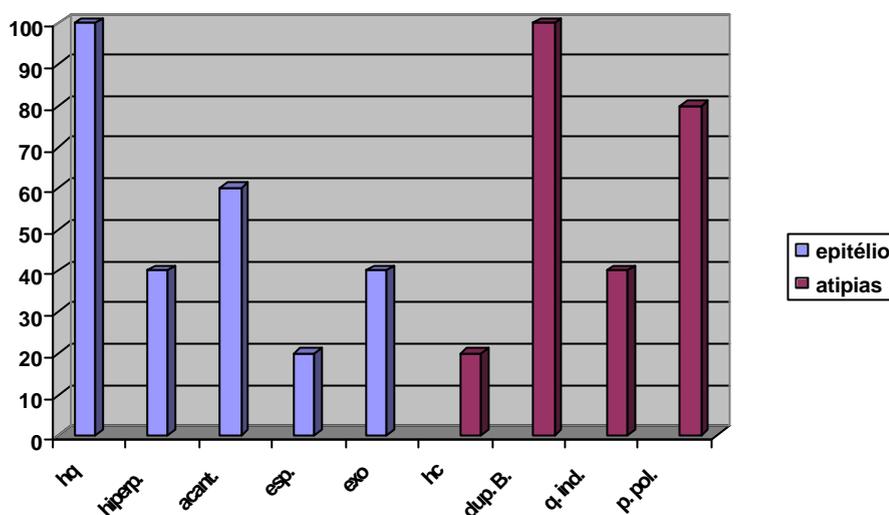


FIGURA 3 - Achados histopatológicos do segundo sacrifício. hq: hiperqueratinização; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; hc: hiperchromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; q. ind: queratinização individual; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal.

5.2.2.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos não apresentaram alteração de forma, tamanho ou número, com média 2.28, por núcleo.

5.2.3 Terceiro sacrifício ou oitava semana de aplicação

5.2.3.1 Aspecto clínico

Os cinco animais (100%) deste grupo apresentavam regiões eritematosas de permeio a áreas esbranquiçadas, ásperas, com menor brilho e formando clinicamente alterações semelhantes a placas eritroleucoplásicas (Figura 14 D).

5.2.3.2 Aspecto histopatológico

Neste grupo observou-se hiperortoqueratose em cinco animais (100%) com um (20%) apresentando também área de hiperparaqueratina. A acantose estava presente nos cinco animais (100%), exocitose estava presente em quatro animais (80%) e a hiperplasia dos cones epiteliais em três (60%), alterações estas mais exarcebadas em relação aos grupos anteriores. As atipias presentes somente nas células da camada basal foram a duplicação das células da camada basal presente nos cinco animais (100%), a perda da polaridade em dois animais (40%), aumento do tamanho do núcleo em dois (40%) e hiper cromatismo celular, em um animal (20%); dois animais (40%) apresentavam projeção em gota do epitélio, sendo em um (20%) deles, se observou células com queratinização individual, achados estes tabulados na Figura 4.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que dois animais (40%) apresentavam atipia classificada como moderada e um (20%) atipia leve.

Em todos os animais a lâmina própria apresentou-se como uma estreita faixa de tecido conjuntivo fibroso com a presença de discreto infiltrado inflamatório em três animais (60% do grupo), moderado em um (20%) e infiltrado inflamatório intenso em um animal (20%).

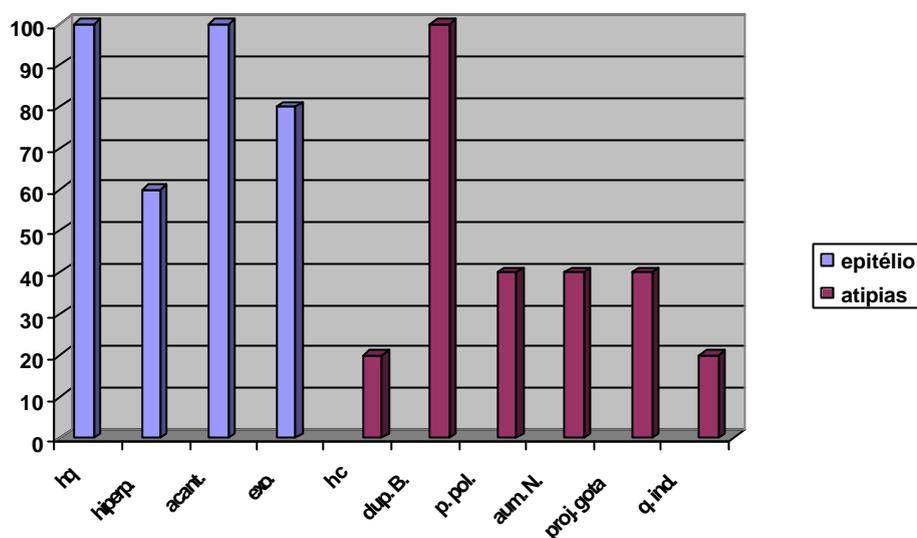


FIGURA 4 - Achados histopatológicos do terceiro sacrifício. hq: hiperqueratinização; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; exo: exocitose; hc: hiper Cromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; aum. N: aumento do volume nuclear; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual.

5.2.3.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos não apresentaram alteração de forma, tamanho ou número, com média 2.43, por núcleo.

5.2.4 Quarto sacrifício ou décima semana de aplicação

5.2.4.1 Aspecto clínico

Nos animais deste grupo observou-se duas alterações: a primeira de forma constante nos cinco (100%) conferiam ao epitélio coloração esbranquiçada, porém mais liso e com um certo brilho quando

comparados aos grupos anteriores em quatro (80%) deles, à semelhança de uma placa leucoplásica homogênea (Figura 14 F); a segunda alteração observada, foram lesões nodulares esbranquiçadas com pontos eritematosos (Figura 14 E) em dois animais (40%).

5.2.4.2 Aspecto histopatológico

Ao exame histopatológico, a hiperortoqueratose estava presente em quatro (80%) animais, sendo a hiperparaqueratina (Figura 19 B) também observada em um deles (20%) e o outro (20%) com paraqueratina. A acantose e hiperplasia dos cones epiteliais estavam nos cinco animais (100%), sendo dois deles (40%) apresentando crescimentos epiteliais exofíticos; espongirose e atrofia epitelial (Figura 19 C e E) em um animal (20%) e exocitose, em quatro (80%). Nas atipias, a duplicação basal estava em quatro (80%), a perda da polaridade das células da camada basal e aumento das figuras mitóticas em três (60%), hiperchromatismo celular em quatro (80%), pleomorfismo celular e queratinização individual de células em dois (40%). Notou-se ainda perda da estratificação epitelial, aumento do volume nuclear, nucléolos aumentados, projeção em gota e mitoses atípicas em um animal (20%), achados estes tabulados na Figura 5.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que dois animais (40%) apresentavam atipia leve, dois (40%) atipia moderada e um (20%) já com carcinoma com invasão abaixo da lâmina própria.

Em todos os animais a lâmina própria apresentou-se como uma estreita faixa de tecido conjuntivo fibroso com a presença de discreto infiltrado inflamatório em quatro animais (80%) do grupo e intenso, em um animal (20%).

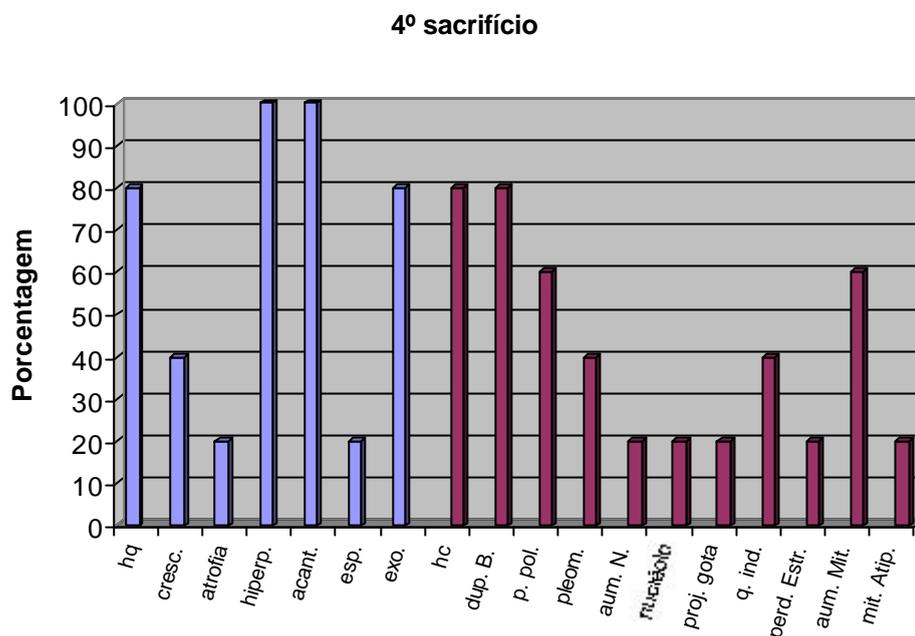


FIGURA 5 - Achados histopatológicos do quarto sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; hc: hiperchromatismo; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

5.2.4.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de número, com média 2.47, por núcleo. O animal que expressou carcinoma com invasão abaixo da lâmina própria, apresentou média individual de NORs com 3.06 NORs por núcleo, menores que os apresentados no padrão interfásico, com contorno irregular e presentes

em um número maior de células, caracterizando o surgimento do padrão mitótico, indicando aumento da atividade de proliferação celular.

5.2.5 Quinto sacrifício ou 12^a semana de aplicação

5.2.5.1 Aspecto clínico

Nos cinco (100%) animais deste grupo houve a formação de áreas eritematosas e esbranquiçadas em maior ou menor intensidade, apresentando-se a semelhança de placas eritroleucoplásicas. Houve também formação de pápulas que tinham coloração branca em quatro animais (80%) e um (20%) com lesão papilomatosa com superfície eritroleucoplásica (Figura 15 A).

5.2.5.2 Aspecto histopatológico

Na análise histopatológica os cinco animais (100%) apresentavam hiperortoqueratose, hiperplasia dos cones epiteliais e acantose, quatro (80%) com hiperparaqueratina, um (20%) com área desqueratinizada (Figura 19 F); três (60%) com paraqueratina, crescimentos epiteliais exofíticos, espongiose, exocitose e acantólise (figura 18 A e B), em dois (40%) com atrofia epitelial (Figura 19 C). Nas atipias, a duplicação das células da camada basal e hiperchromatismo celular estavam nos cinco animais (100%), projeção em gota dos cones epiteliais (Figura 19 A) e perda da polaridade das células da camada basal em quatro (80%); pleomorfismo celular, aumento do volume nuclear e queratinização individual em três (60%), perda da estratificação epitelial em dois (40%), nucléolos aumentados, aumento de figuras mitóticas,

sendo algumas atípicas em um (20%), resultados estes tabulados na Figura 6.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que três animais (60%) apresentaram atipia moderada, um atipia severa (20%) e um animal (20%), carcinoma com invasão da lâmina própria. Na lâmina própria, infiltrado inflamatório leve foi observado em quatro animais (80%) e intenso, em um (20%).

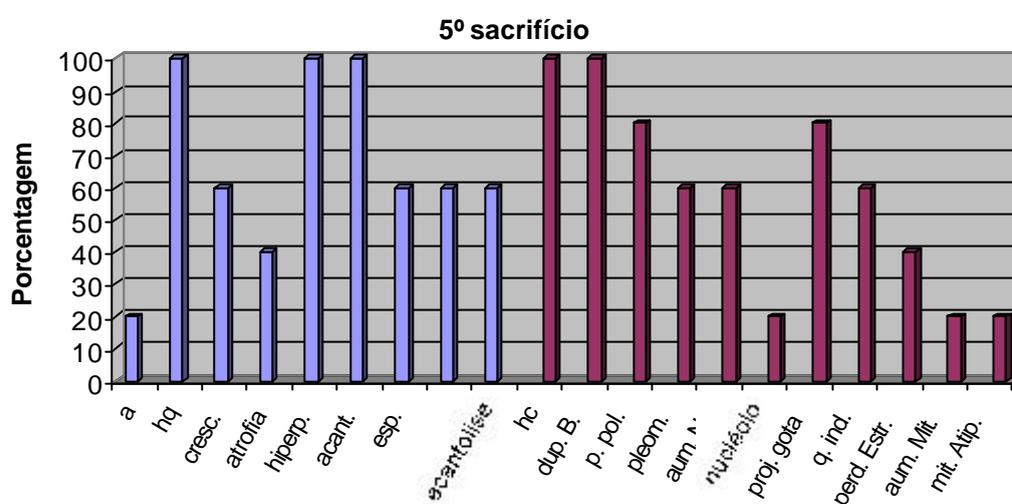


FIGURA 6 - Achados histopatológicos do quinto sacrifício. a: área desqueratinizada; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; acantólise: acantólise; hc: hiperchromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atíp: mitoses atípicas.

5.2.5.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de número, com média 2.67, por núcleo. O animal que expressou carcinoma com invasão da lâmina própria, apresentou média individual de NORs com 2,68 NORs por núcleo, menores que os apresentados no padrão interfásico, com contorno irregular e presentes em um número maior de células, caracterizando padrão mitótico, indicando aumento da atividade de proliferação celular.

5.2.6 Sexto sacrifício ou 14^a semana de aplicação

5.2.6.1 Aspecto clínico

Nos cinco animais (100%) constatou-se um epitélio esbranquiçado, áspero, com certo brilho, de permeio áreas ou pontos eritematosos à semelhança de uma placa eritroleucoplásica, tendo pápulas esbranquiçadas (Figura 15 B) se destacado em três animais (60%).

5.2.6.2 Aspecto histopatológico

Na observação histopatológica a paraqueratina, acantose e hiperplasia dos cones epiteliais estavam nos cinco animais (100%), a hiperparaqueratina e hiperortoqueratina em três animais (os cinco apresentavam hiperqueratinização), exocitose em quatro (80%), atrofia epitelial em três (60%), espongirose e acantólise em dois (40%) e crescimento epitelial exofítico em um (20%). Quanto às atipias, a duplicação das células da camada basal, pleomorfismo celular, hiper cromatismo celular, perda da polaridade das células da camada

basal e projeção em gota do epitélio estavam presentes nos cinco animais (100%), aumento do volume nuclear e queratinização individual em quatro (80%), perda da estratificação epitelial em três (60%), nucléolos aumentados e mitoses atípicas em dois (40%), e aumento de figuras mitóticas e perda da coesão celular em um (20%), achados estes tabulados na Figura 7.

Quanto ao grau de atipia, concluiu-se que um animal (20%) apresentou atipia moderada; um (20%), atipia severa, um (20%) carcinoma *in situ* e dois (40%) com carcinomas com invasão da lâmina própria. Infiltrado inflamatório leve foi observado em quatro animais (80%).

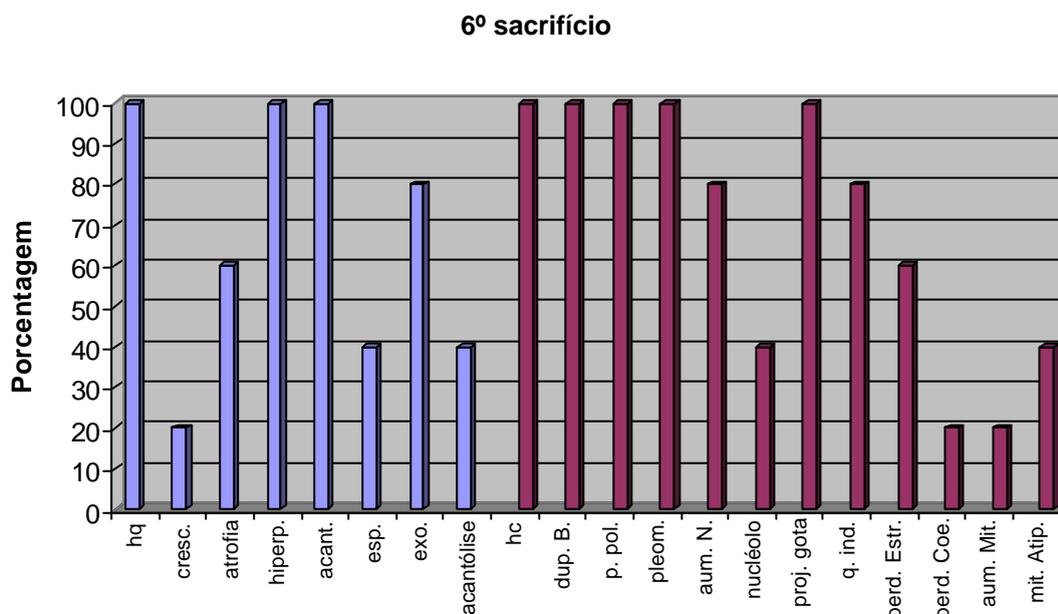


FIGURA 7 - Achados histopatológicos do sexto sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr:

perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

5.2.6.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de número, com média 2.83, por núcleo. O animais que expressaram carcinoma com invasão da lâmina própria, apresentaram médias individuais de NORs com 3.48 e 2.59 NORs por núcleo, o animal com carcinoma *in situ*, 2.43, em todos as NORs se encontraram menores que os apresentados no padrão interfásico, com contorno irregular e presentes em um número maior de células, caracterizando o padrão mitótico, indicando aumento da atividade de proliferação celular.

5.2.7 Sétimo sacrifício ou 16ª semana de aplicação

5.2.7.1 Aspecto clínico

Neste grupo os cinco animais (100%) apresentaram áreas esbranquiçadas, ásperas, umas brilhantes, outras com perda do brilho entremeadas por áreas eritematosas em três animais (60%) à semelhança da eritroleucoplasia, tendo quatro animais (80%) pápulas esbranquiçadas e um (20%) lesão papilomatosa discreta (Figura 15 B).

5.2.7.2 Aspecto histopatológico

Os achados histopatológicos foram paraqueratina, hiperplasia dos cones epiteliais, acantose e espongiose nos cinco animais (100%), hiperortoqueratina e exocitose em quatro animais (80%), crescimento epitelial exofítico em três (60%), hiperparaqueratina, atrofia epitelial, acantólise e microabscesso (Figura 20 D) em dois (20%), áreas desqueratinizadas em um (20%). Quanto as atipias, a duplicação das células da camada basal e projeção em gota dos cones epiteliais estavam nos cinco animais (100%), perda da polaridade das células da camada basal, hiper cromatismo celular, queratinização individual em quatro (80%), pleomorfismo celular em três (60%), perda da estratificação epitelial e aumento do volume nuclear em dois (40%), mitoses atípicas, aumento das figuras mitóticas e perda da coesão celular em um animal (20%), achados estes tabulados na figura 08 e exemplificados na Figura 20 F.

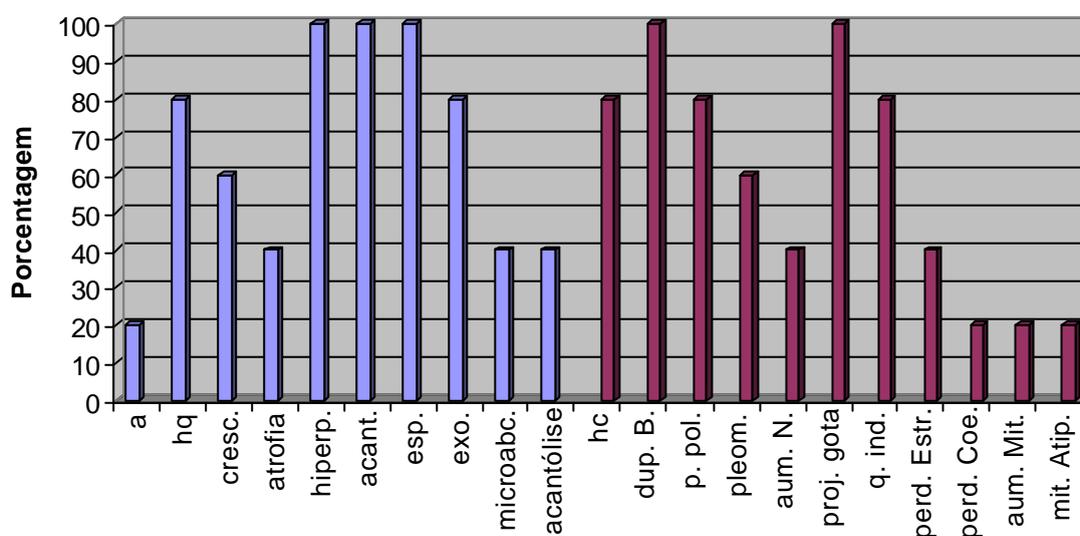


FIGURA 8 - Achados histopatológicos do sétimo sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento

do volume nuclear; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

Quanto ao grau de atipia concluiu-se que um animal (20%) foi classificado com atipia leve, um (20%), com atipia moderada, um (20%), com atipia severa, um (20%) carcinoma *in situ* (Figura 20 A) e um carcinoma apresentando invasão da lâmina própria. Infiltrado inflamatório estava presente em três animais (60%), destes, um leve, um em quantidade moderada e outro, intensa.

5.2.7.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de forma, tamanho nos animais com o câncer instalado, com média 2.75, por núcleo. O animal com carcinoma *in situ*, apresentou média individual de NORs com 2.42 NORs por núcleo e o animal com carcinoma com invasão da lâmina própria apresentou média individual de 2,77 NORs por núcleo, em ambos as NORs se apresentaram menores que o expresso no padrão interfásico, com contorno irregular e presentes em um numero maior de células, caracterizando o padrão mitótico, indicando aumento da atividade de proliferação celular.

5.2.8 Oitavo sacrifício ou 18^a semana de aplicação

5.2.8.1 Aspecto clínico

Nos cinco animais (100%) deste grupo foi encontrado áreas esbranquiçadas, ásperas e com perda do brilho, à semelhança de placas

leucoplásicas, em dois deles tendo pápulas, em três animais (60%) apresentavam lesões papilomatosas (Figura 15 C) e dois lesões nodulares (40%), contendo áreas eritroleucoplásica nas cinco línguas (100%).

5.2.8.2 Aspecto histopatológico

Os achados histopatológicos foram quatro animais (80%) apresentando paraqueratina, três com hiperortoqueratina (60%), dois apresentavam áreas sem queratina (40%) e um com hiperparaqueratina (20%). O epitélio apresentava-se com acantose, hiperplasia dos cones epiteliais, crescimento epitelial exofítico, espongirose e exocitose nos cinco animais (100%), microabscesso em quatro (80%), acantólise em três (60%) e atrofia epitelial em um (20%). Quanto às atipias, pleomorfismo celular, perda da estratificação, hiperchromatismo celular, aumento do volume nuclear, aumento dos nucléolos, duplicação das células da camada basal, queratinização individual, projeção em gota dos cones epiteliais e perda da polaridade das células da camada basal estavam presentes nos cinco animais (100%), perda de coesão celular em três (60%), aumento de figuras mitóticas e mitoses atípicas em um animal (20%), achados estes tabulados na Figura 9 e exemplificados na Figura 21 A e B.

Com relação às alterações, concluiu-se que um animal (20%) apresentou carcinoma com invasão da lâmina própria, dois (40%) com carcinoma com invasão abaixo da lâmina própria e dois (40%) com invasão extensa e profunda (Figura 21 A e B). O infiltrado inflamatório foi intenso em três animais (60%), moderado em um (20%) e leve noutro (20%).

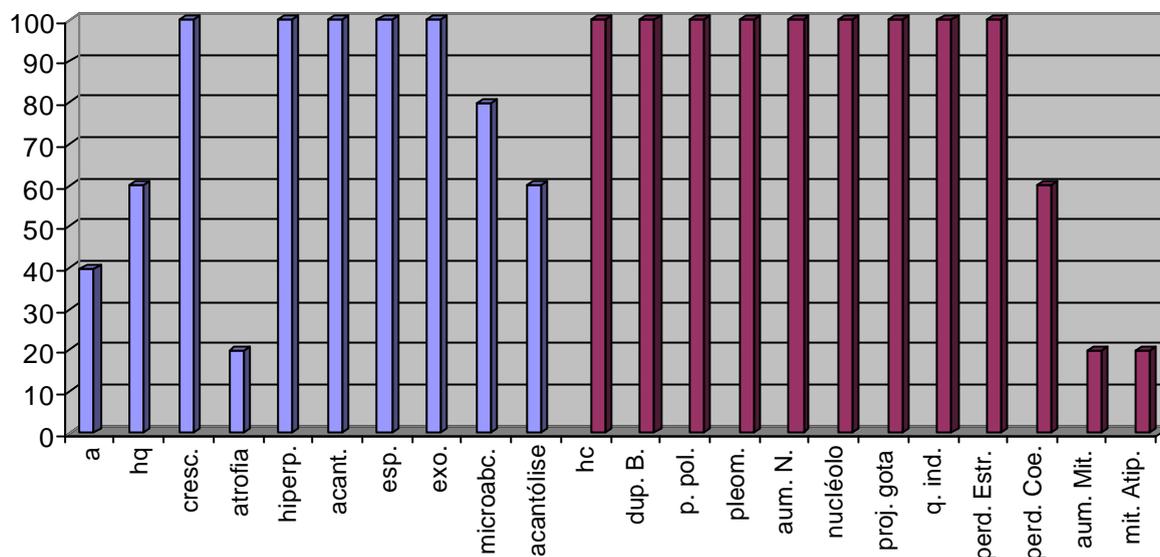


FIGURA 9 - Achados histopatológicos do oitavo sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolos: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

5.2.8.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de forma, tamanho e número, com média 3.23, por núcleo, caracterizando o padrão mitótico, onde as NORs se apresentaram como estruturas numerosas, na maioria das vezes pequenas e irregulares, com número igual ou superior a três.

5.2.9 Nono sacrifício ou vigésima semana de aplicação

5.2.9.1 Aspecto clínico

Os cinco animais (100%) deste grupo apresentavam áreas eritematosas de permeio a áreas esbranquiçadas, ásperas e com variações na intensidade do brilho, à semelhança de uma placa eritroleucoplásica, tendo três animais lesões nodulares de superfície eritroleucoplásica (Figura 15 D) e uma lesão papilomatosa pequena também com superfície à semelhança dos nódulos.

5.2.9.2 Aspecto histopatológico

Na análise histopatológica foi observado a presença hiperortoqueratina, paraqueratina, espongirose, exocitose e acantólise em quatro animais (80%), hiperparaqueratina, áreas desqueratinizadas, atrofia epitelial e microabscesso em três animais (60%), acantose, hiperplasia dos cones epiteliais e crescimento epitelial exofítico nos cinco (100%). Quanto às atipias, duplicação das células da camada basal, perda da polaridade das células basais, hiperchromatismo celular e projeção em gota dos cones epiteliais estavam presentes também nos cinco animais (100%), pleomorfismo celular, perda da estratificação epitelial e queratinização individual estavam em quatro animais (80%), aumento do volume nuclear, nucléolos aumentados, aumento de figuras mitóticas, mitoses atípicas e perda da coesão celular estavam presentes em três animais (60%), achados estes tabulados na Figura 10.

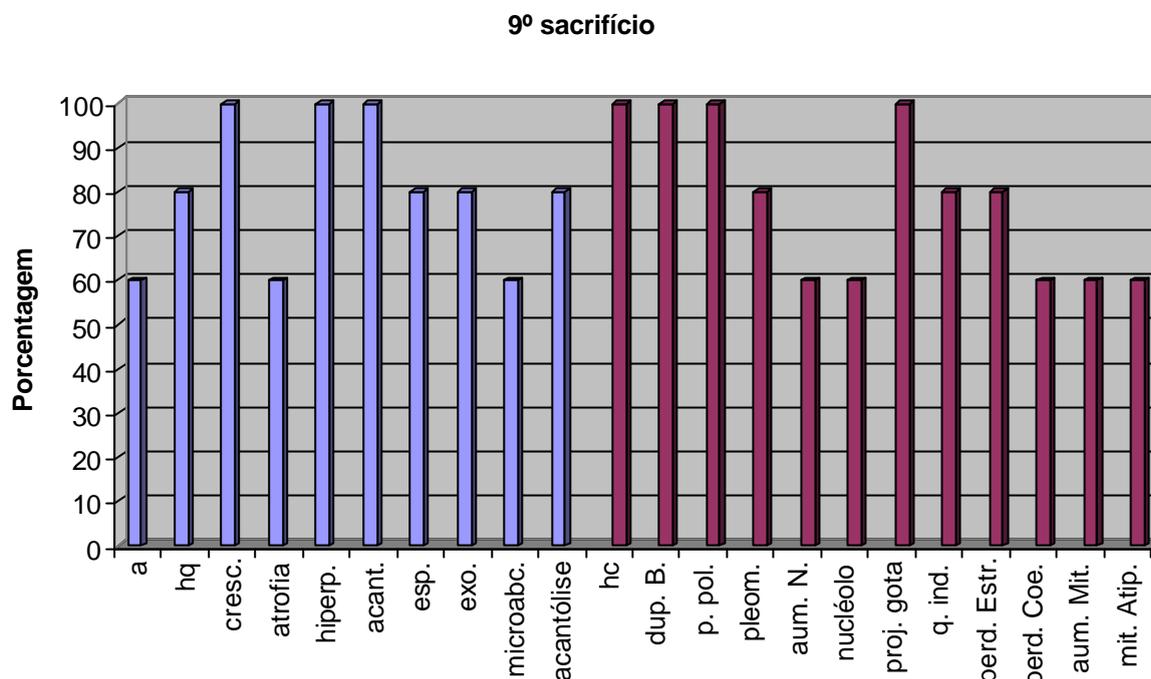


FIGURA 10 - Achados histopatológicos do nono sacrifício. a: ausência de queratinização; hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiper Cromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

Quanto à atipia, concluiu-se que um (20%) animal apresentou-se com atipia moderada e os outros quatro (80%) apresentaram carcinomas, destes, um (20%) com invasão da lâmina própria e os outros três (60%) com invasão abaixo da lâmina própria.

Infiltrado inflamatório leve estava presente em dois animais (40%); um animal (20%), moderado e dois animais (40%), infiltrado inflamatório intenso.

5.2.9.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de forma, tamanho e número, com média 3.11, por núcleo.

5.2.10 Décimo sacrifício ou 22^a semana de aplicação

5.2.10.1 Aspecto clínico

Os quatro animais (100%) deste grupo apresentaram alteração na coloração do epitélio, tornando-se este mais esbranquiçado, áspero e com alteração do brilho intercalado por pontos ou áreas eritematosas à semelhança de uma placa eritroleucoplásica. Dois animais (50%) tinham lesões papulares esbranquiçadas, um animal (25%) apresentou lesão papilomatosa e outro (25%), lesão nodular, ambas com superfície eritroleucoplásica (Figura 15 E).

5.2.10.2 Aspecto histopatológico

Histopatologicamente foi observado presença de hiperortoqueratina, paraqueratina, hiperplasia dos cones epiteliais, acantose, espongirose e exocitose nos quatro animais (100% do grupo). Hiperparaqueratina e microabscesso estavam em um animal (25%). Crescimento epitelial exofítico estava presente em três animais (75%),

havia atrofia epitelial e acantólise em dois (50%). Quanto às atipias, pleomorfismo celular, perda da estratificação epitelial, hiperchromatismo celular, aumento do volume nuclear, nucléolos aumentados, duplicação das células da camada basal, queratinização individual e perda da polaridade das células da camada basal foram alterações observadas nos quatro animais (100% do grupo), projeção em gota dos cones epiteliais e mitoses atípicas estavam em três animais (75%), aumento de figuras mitóticas e perda da coesão celular estavam em dois animais (50%), achados estes tabulados na Figura 11.

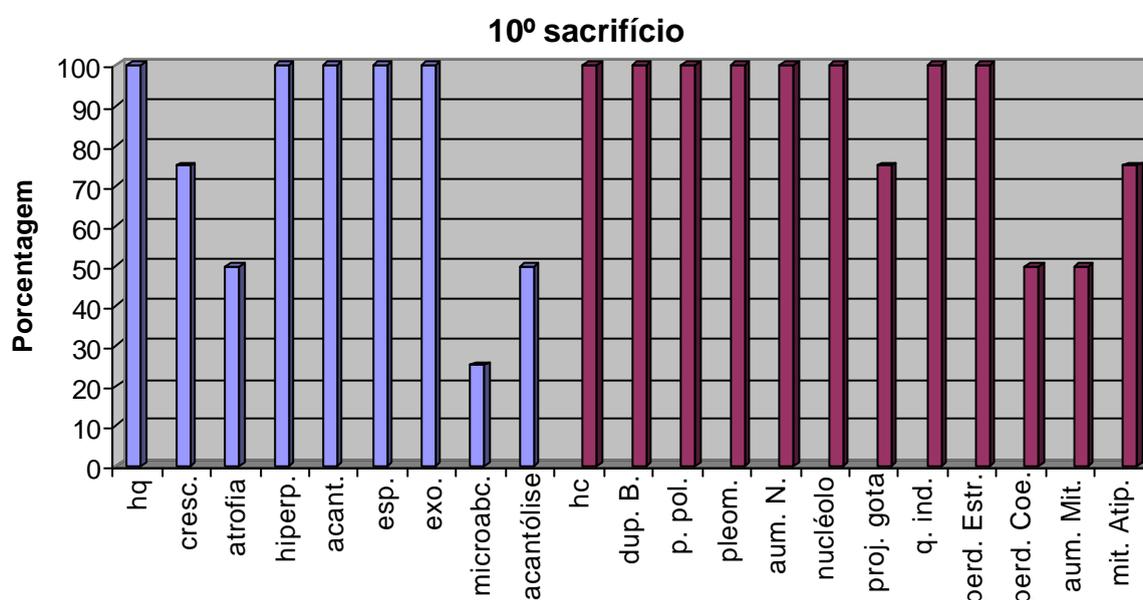


FIGURA 11 - Achados histopatológicos do décimo sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exófito; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongirose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiperchromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

Todos os animais deste grupo apresentaram carcinomas, sendo três (75%) com invasão da lâmina própria e um (25%) com invasão extensa e profunda (Figura 18 C). Um infiltrado inflamatório leve foi observado em um (25%) animal e nos outros três (75%) foi intenso.

5.2.10.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de forma, tamanho e número, com média 3.20, por núcleo.

5.2. 11^o sacrifício ou 24^a semana de aplicação

5.2.11.1 Aspecto clínico

Nos três animais deste grupo (100%) a alteração observada foi de uma mucosa esbranquiçada, áspera e com perda do brilho, um animal (33,3%) apresentava pápulas permeadas por área eritoplásica (Figura 15 F), outro (33,3%) apresentava lesão papilomatosa e outro (33,3%) uma lesão nodular, ambos, com superfícies eritematosas e esbranquiçadas.

5.2.11.2 Aspecto histopatológico

Histopatologicamente constatou-se presença de paraqueratina, crescimento epitelial exófito, hiperplasia dos cones epiteliais, acantose, espongiose e exocitose nos três animais (100%), hiperortoqueratose e microabscesso em dois animais (66,6%), atrofia epitelial e acantólise em apenas um animal (33,3%). Quanto às atipias, pleomorfismo celular, perda da estratificação epitelial, hiper Cromatismo

celular, aumento do volume nuclear, nucléolos aumentados, duplicação das células da camada basal, queratinização individual, projeção em gota dos cones epiteliais, perda de coesão celular e perda da polaridade das células da camada basal foram observadas nos três animais (100%), aumento de figuras mitóticas em dois (66,6%), e mitoses atípicas em apenas um (33,3%) animal, achados estes tabulados na Figura 12.

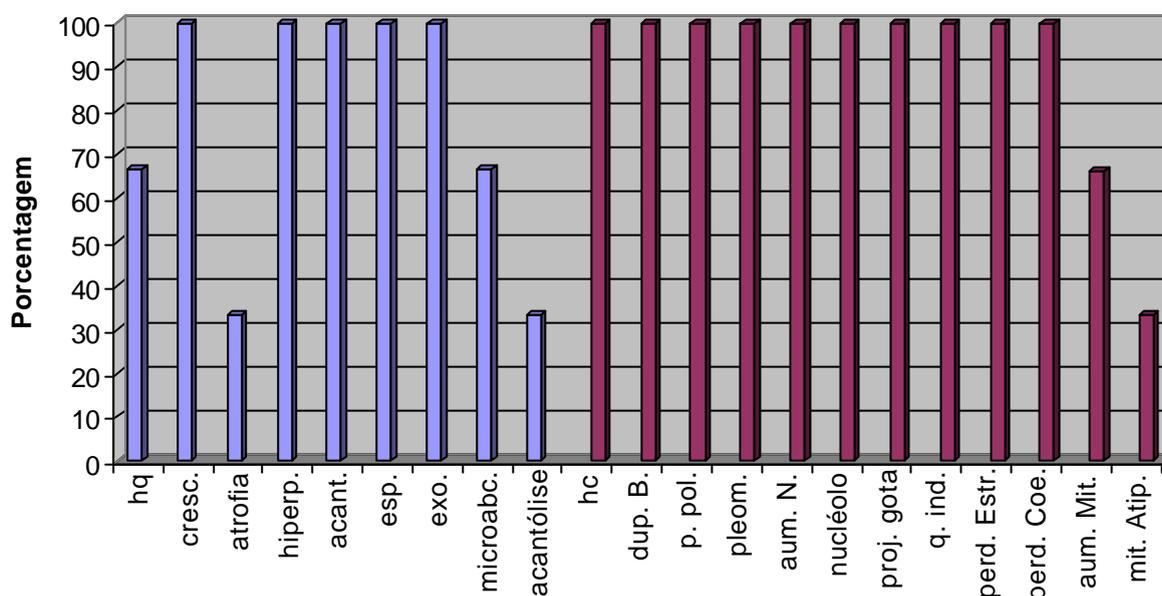


FIGURA 12 - Achados histopatológicos do décimo primeiro sacrifício. hq: hiperqueratinização; cresc: crescimento epitelial exofítico; atrofia: atrofia epitelial; hiperp: hiperplasia dos cones epiteliais; acant: acantose; esp: espongiose; exo: exocitose; microabc: microabscesso; acantólise: acantólise; hc: hiperchromatismo celular; dup. B: duplicação das células da camada basal; p. pol: perda da polaridade das células da camada basal; pleom: pleomorfismo celular; aum. N: aumento do volume nuclear; nucléolo: nucléolos aumentados; proj. gota: projeção em gota dos cones epiteliais; q. ind: queratinização individual; perd. Estr: perda da estratificação epitelial; perd. Coe: perda da coesão celular; aum. Mit: aumento de figuras mitóticas; mit. Atip: mitoses atípicas.

Todas as lesões eram carcinomas, sendo um (20%) com invasão da lâmina própria e dois com invasão abaixo da lâmina própria.

5.2.11.3 Aspecto da AgNOR

Em análise, as NORs dos cortes histológicos apresentaram alteração de forma, tamanho e número, com média 3.19, por núcleo.

5.3 Síntese dos resultados

O epitélio do bordo lateral da língua dos hamsteres do grupo controle apresentou-se durante todo o experimento liso, brilhante e avermelhado, do tipo pavimentoso estratificado, sendo sua espessura de quatro a seis células, revestida por fina camada de ortoqueratina. Na análise histopatológica deste grupo observamos que este epitélio tendeu a ter discreto hiper cromatismo, duplicação e perda de polaridade das células da camada basal, achados estes presentes em todos os animais, variações estas consideradas normais em um epitélio que sofre renovação constante (Figura 16 A e B).

As alterações observadas clinicamente no grupo submetido à aplicação de DMBA puderam ser descritas como: epitélio plano esbranquiçado, áspero e com perda do brilho (figura 14 B); placa esbranquiçada semelhante à leucoplasia (figura 14 F); placa esbranquiçada associadas a áreas eritematosas semelhantes a eritroleucoplasia (figura 14 D); placa e pápula(s) esbranquiçadas (figura 14 C); placa e pápulas eritroleucoplásicas (figura 15 F); placa e papilomatose eritroleucoplásica (figura 15 C) e placa e nódulo eritroleucoplásico (figura 15 D). Deve ser ressaltado que durante o experimento as mesmas desenvolveram-se praticamente na seqüência

citada e foram utilizadas como critérios macroscópicos na seleção dos animais a serem sacrificados.

A camada ortoqueratinizada foi constituinte freqüente do quadro histológico dos hamsteres do grupo estudo, observando-se o aumento da espessura desta camada na quarta semana de aplicação do DMBA, época em que foi realizado o primeiro sacrifício. Por vezes este espessamento apresentou-se sob a forma de hiperortoqueratose em áreas distintas do mesmo animal, tendo sido observado em 41 dos 52 animais.

A presença da paraqueratina foi observada a partir da oitava semana de tratamento com DMBA ou terceiro sacrifício. Na décima segunda semana do experimento ou quinto sacrifício, ocorreu o espessamento dessa camada passando a caracterizar a instalação de hiperparaqueratina, que nesse momento se fez presente em 16 animais dos 31 que expressam a paraqueratina em sua superfície.

Todo crescimento que se elevava acima do nível do epitélio foi tabulado como lesões exofíticas, formando um grupo composto pelas pápulas, pelas projeções papilíferas (ou lesões papilomatosas) e pelos nódulos (Figura 17E e 17F; Figura 18E, 18F e figura 20E), independente do tamanho expressado. Lesões com essas características foram notadas a partir do quarto sacrifício do grupo estudo, à exceção de um animal do grupo estudo que apresentou lesão papular já no segundo sacrifício, estiveram presentes em todos os animais do oitavo, nono e décimo primeiro sacrifícios. Em decorrência do critério de seleção dos animais para o sacrifício, que se baseou na presença e expressão clínica das lesões; decorrente também, deste fato, a exacerbação de todos os achados ocorrido nos animais do oitavo sacrifício ou na décima oitava semana de aplicação do grupo estudo, onde os animais selecionados foram aqueles que apresentavam quadro geral agravado pela presença de lesões de maior expressão (Figura 13).

Na décima semana (quarto sacrifício), coincidente com o surgimento das lesões exofíticas, os animais do grupo estudo passam a expressar áreas focais de atrofia epitelial, o que sugeriu um desarranjo no processo metabólico do epitélio, com intuito de promover uma resposta à agressão durante o processo de promoção da carcinogênese, caracterizando-se como alterações expressas ao nível epitelial.

Seguindo uma linha temporal, na sexta semana de aplicação do DMBA (segundo sacrifício) observou-se a presença de hiperplasia dos cones epiteliais, cujo aumento da expressão foi observado a partir da oitava semana de aplicação do DMBA (terceiro sacrifício), fazendo-se presente em todos os animais do grupo estudo a partir do quarto sacrifício.

Acantose foi observada pela primeira vez no primeiro sacrifício expressando-se em um animal do grupo estudo (20%). No segundo sacrifício do grupo estudo ou sexta semana de aplicação, torna-se mais expressiva sendo observada em três animais do grupo estudo (60%) e a partir do terceiro sacrifício (oitava semana de aplicação) passa a ser observada em todos os animais de todo o grupo estudo.

A presença de figuras atípicas de mitose expressou-se em relação direta com o aumento da ocorrência de mitose nas células da camada basal e parabasal, que se deu a partir da décima semana de aplicação ou quarto sacrifício do grupo estudo.

Apesar da duplicação das células da camada basal ser uma constância nos animais do grupo controle, e a presença de algumas células hipercoreadas também estarem presentes, sua expressão se acentua na medida em que aumenta a frequência e a intensidade das atipias no grupo estudo, somando-se o fato destes achados apresentarem maior expressão a partir do terceiro sacrifício ou oitava semana de aplicação do DMBA, onde os achados deixam de estar restritos à camada basal.

A espongiose se tornou um achado expressivo a partir do segundo sacrifício ou sexta semana de aplicação da droga com expressividade variável até o sexto sacrifício ou décima quarta semana de aplicação, com freqüência aproximada de 100% a partir do sétimo sacrifício ou décima sexta semana de aplicação. Com exceção de um animal do sexto sacrifício no grupo estudo, ela se fez presente na maioria dos animais que apresentaram lesões exofíticas. A exocitose foi encontrada em todos os animais de todos os sacrifícios.

Microabscesso se fez presente no sétimo sacrifício ou décima sexta semana de aplicação do DMBA, com freqüência variável até a vigésima quarta semana ou décimo primeiro sacrifício dos animais do grupo estudo.

Acantólise se fez presente na forma de focos isolados, por vezes distante da lesão principal, a partir do quinto sacrifício ou na décima segunda semana de aplicação do DMBA, coincidindo com o aumento do grau de atipia de moderado, até o carcinoma instalado. Na grande maioria dos casos as superfícies de revestimento encontradas eram compostas por paraqueratina.

No primeiro sacrifício do grupo estudo ou quarta semana um animal do grupo estudo apresentou discreto pleomorfismo celular localizado na porção de transição entre o bordo lateral e o soalho lingual; este achado se tornou significativo a partir da décima semana de aplicação do DMBA ou quarto sacrifício, onde se notou aumento da intensidade, diretamente proporcional à freqüência; fato este correlato à severidade das atipias observadas nos sacrifícios dos animais do grupo estudo que se procederam.

Os dados sugeriram uma possível relação entre o aumento da freqüência e da intensidade do pleomorfismo celular com a observação das projeções em gota do epitélio, cuja expressão máxima dos dois achados se deram no sexto sacrifício dos animais do grupo estudo ou décima quarta semana de aplicação.

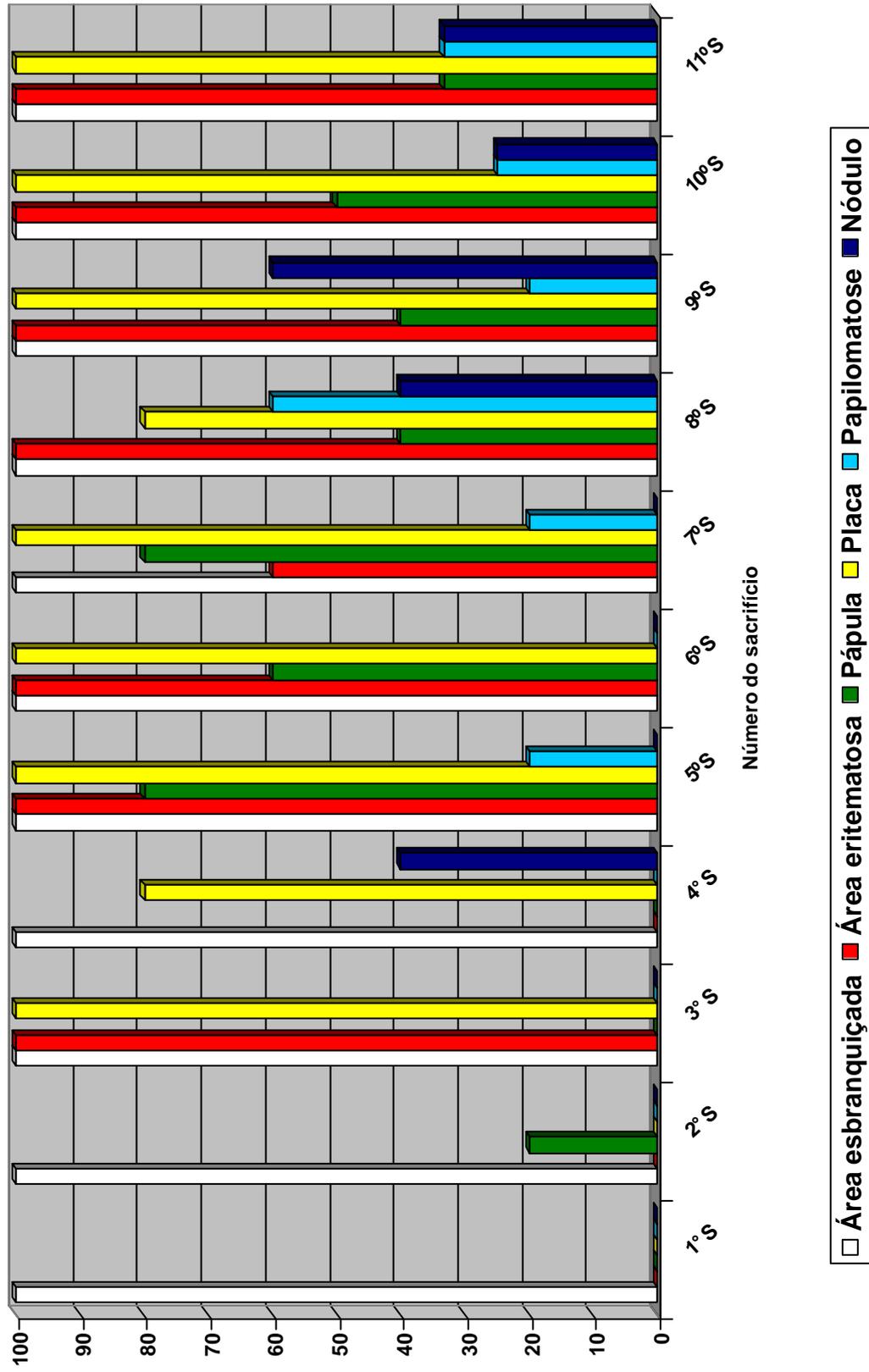
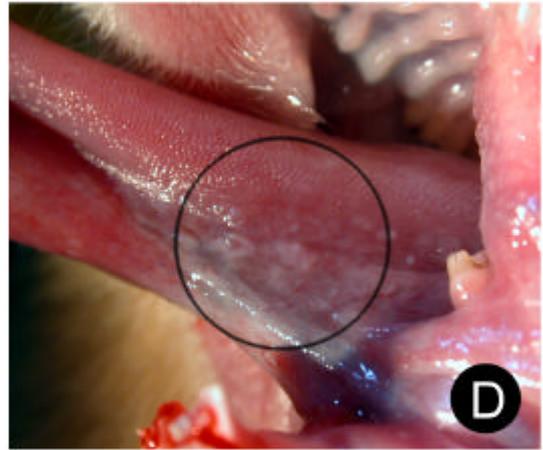
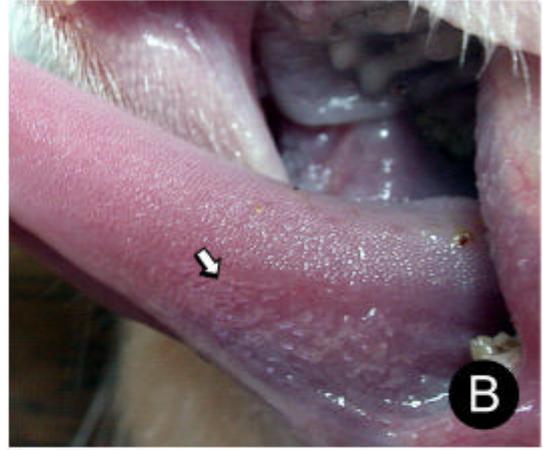
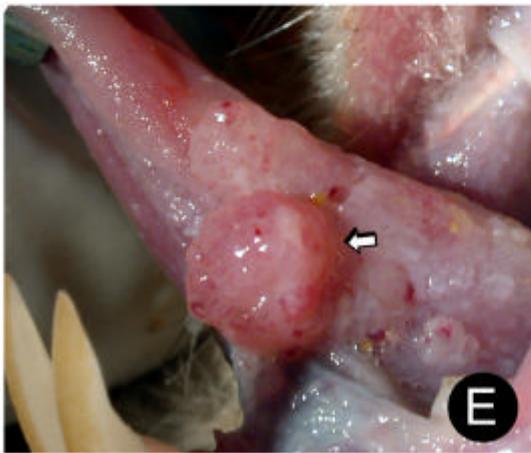
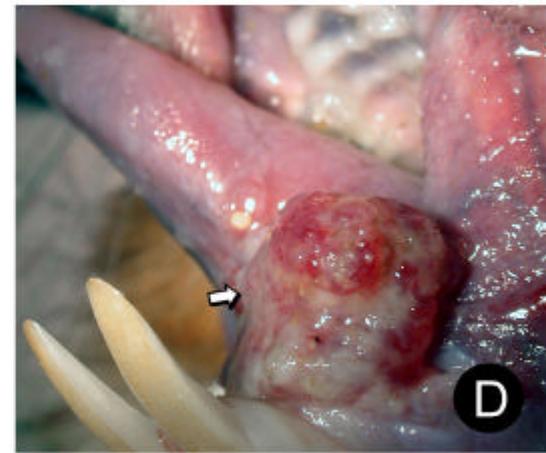
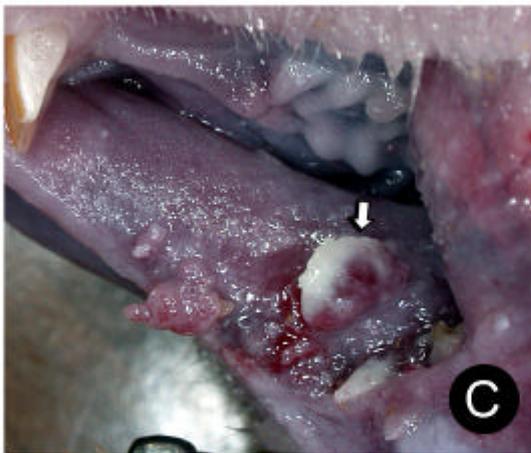
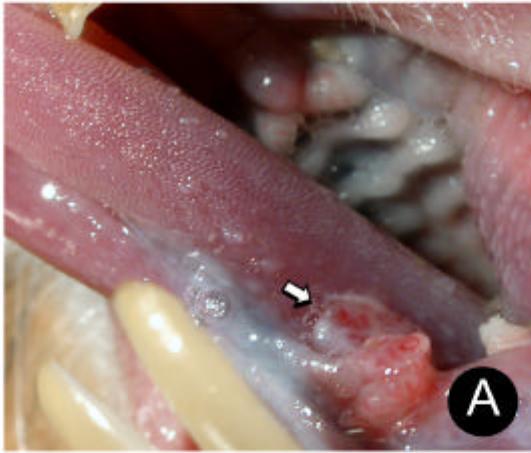
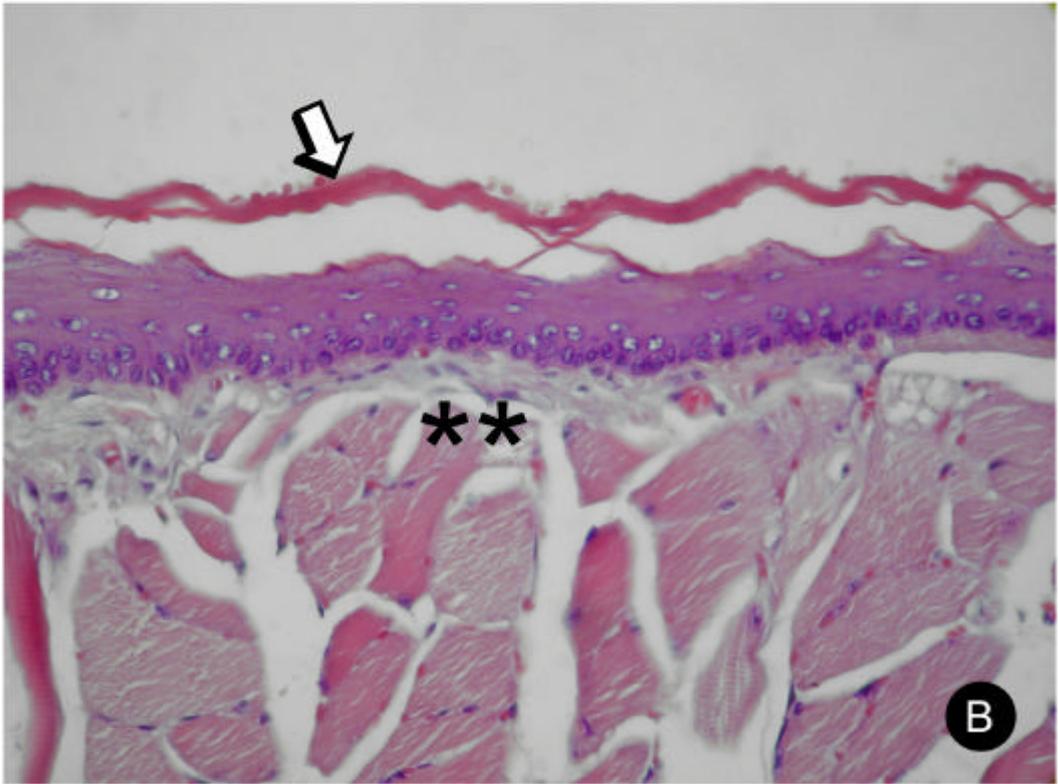
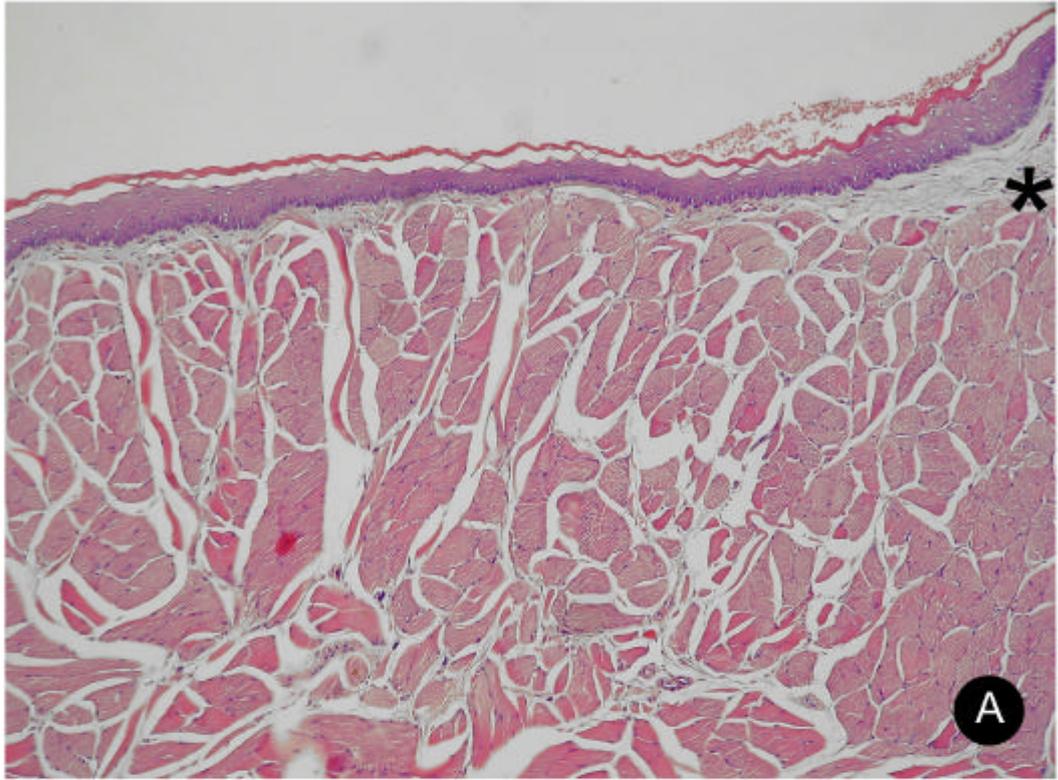
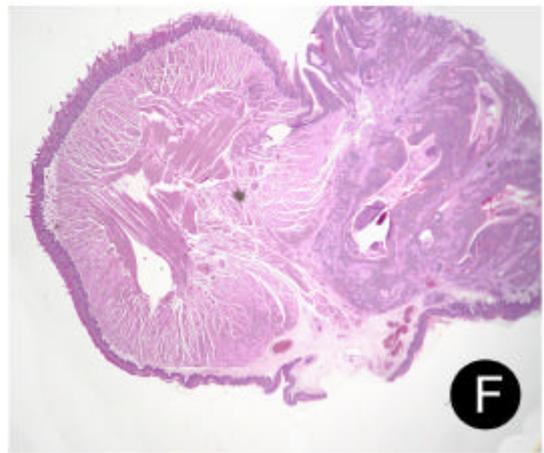
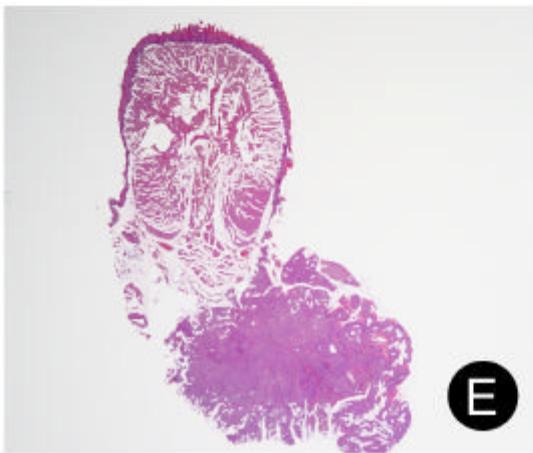
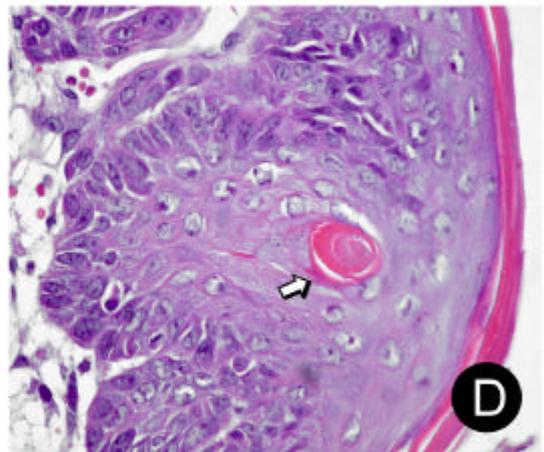
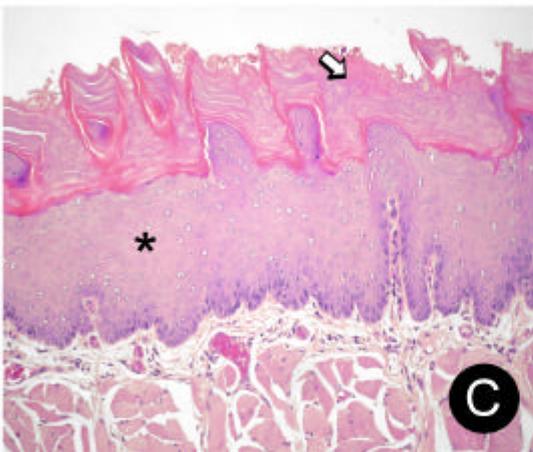
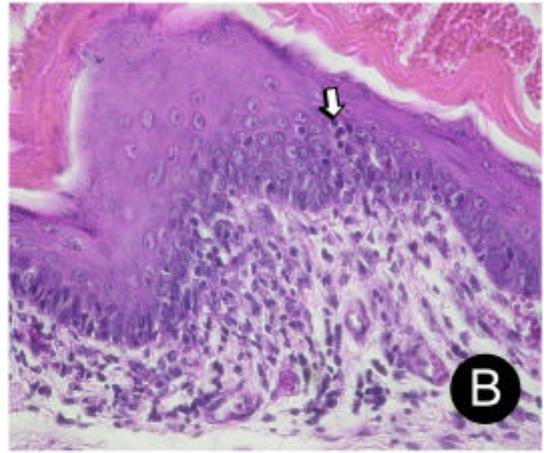
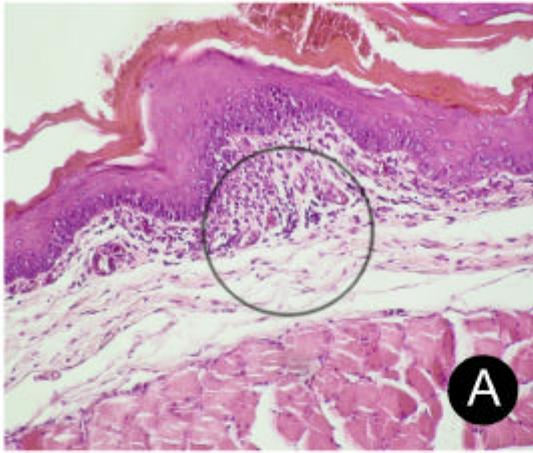


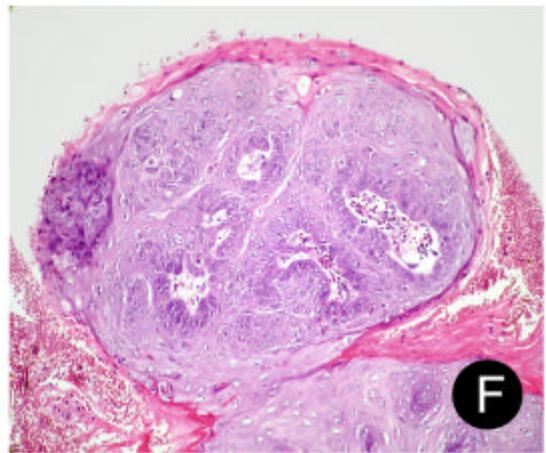
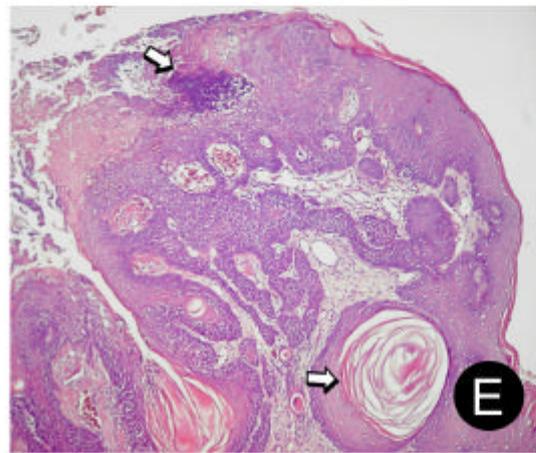
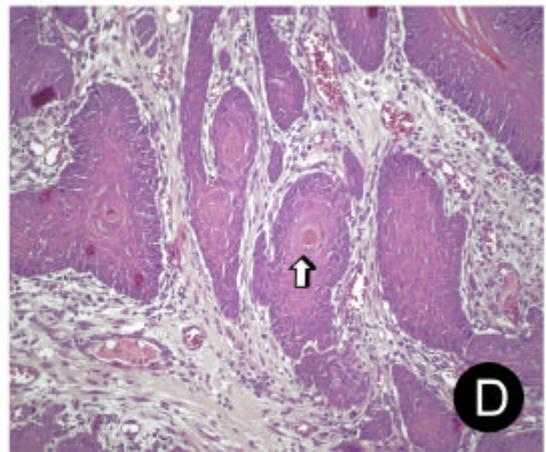
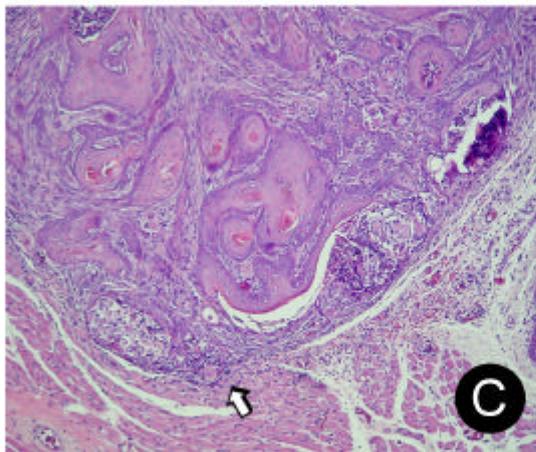
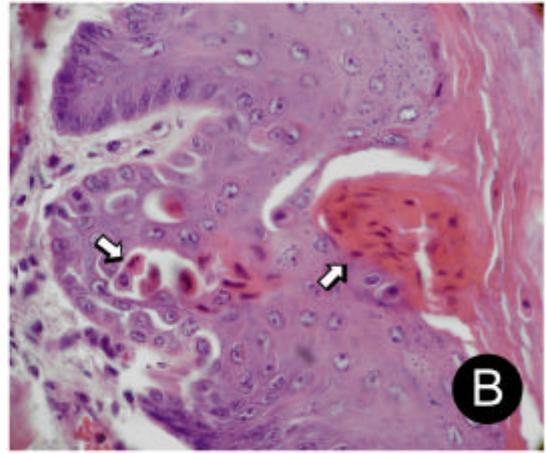
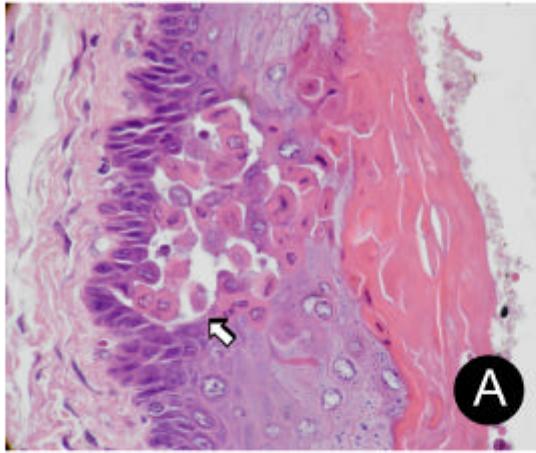
FIGURA 13 - Aspectos clínicos apresentados no grupo estudo por sacrifício.

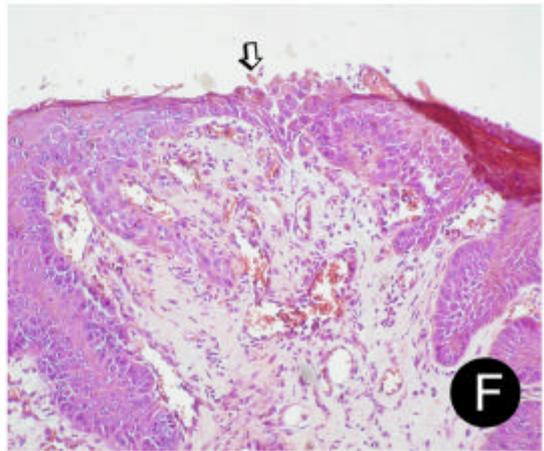
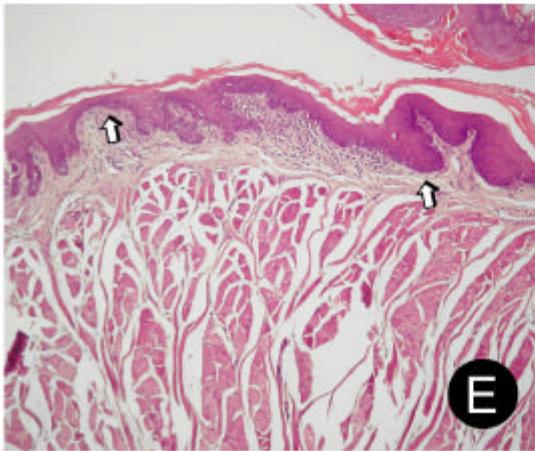
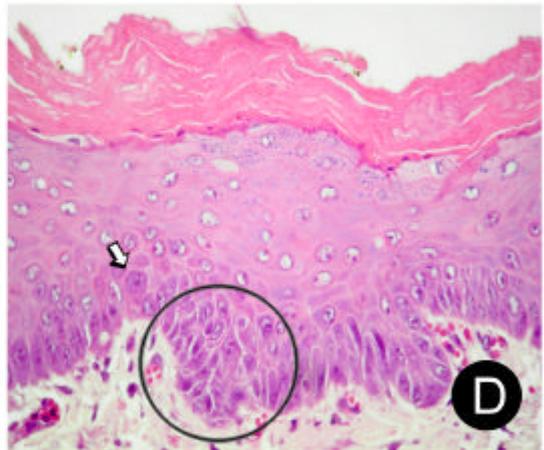
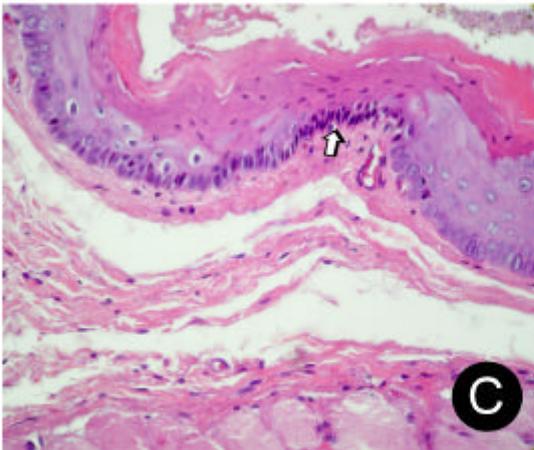
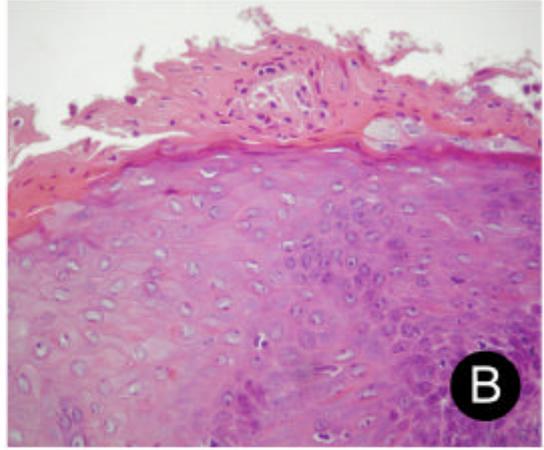
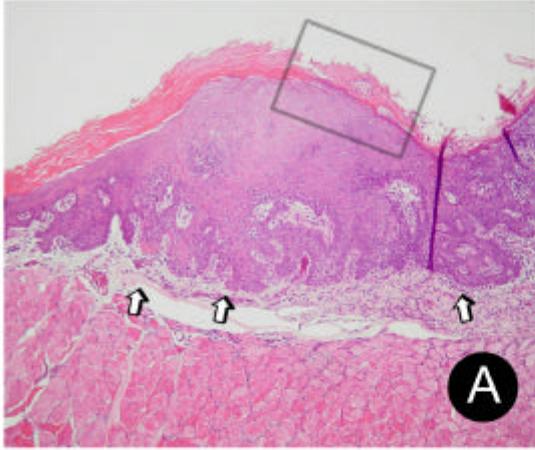


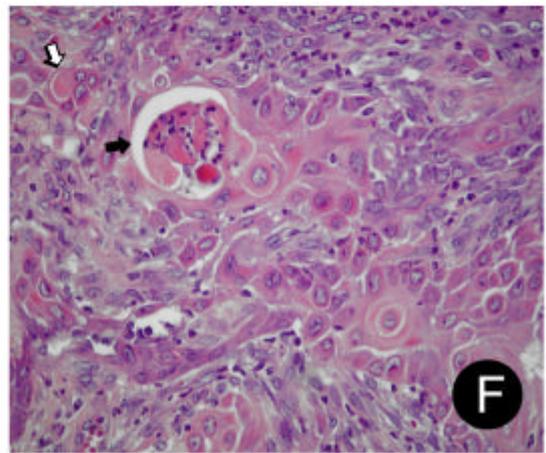
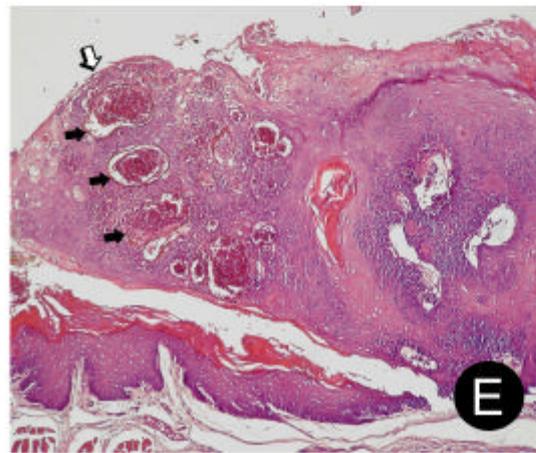
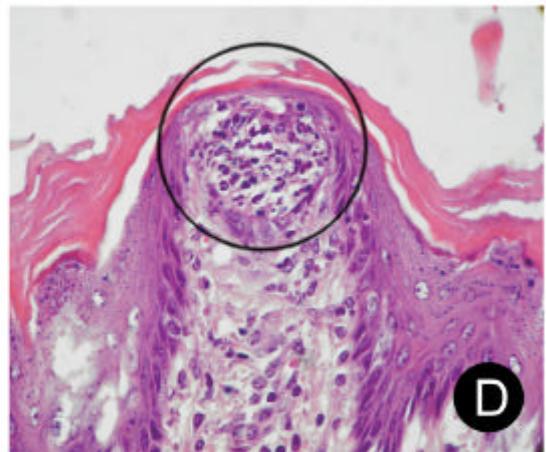
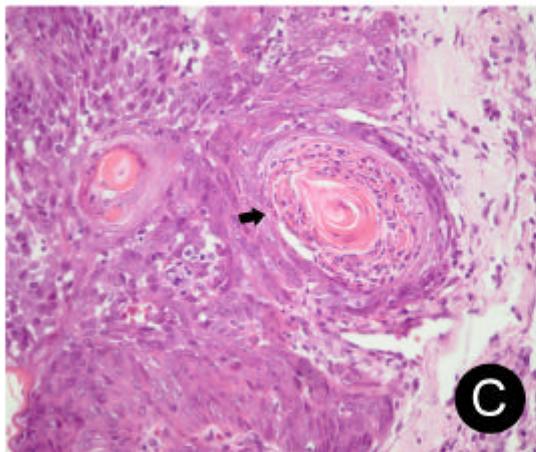
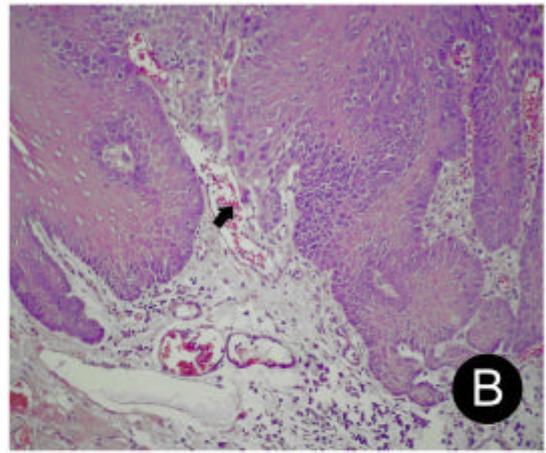
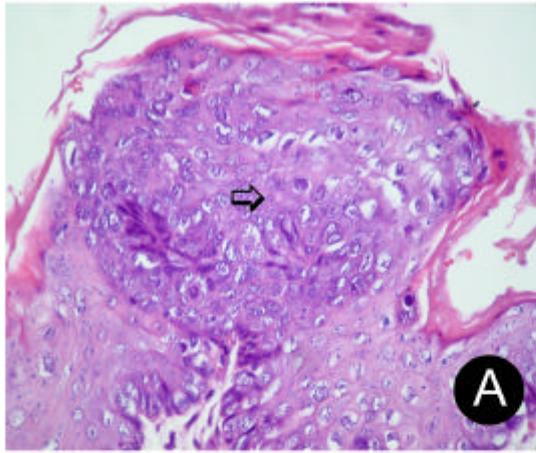


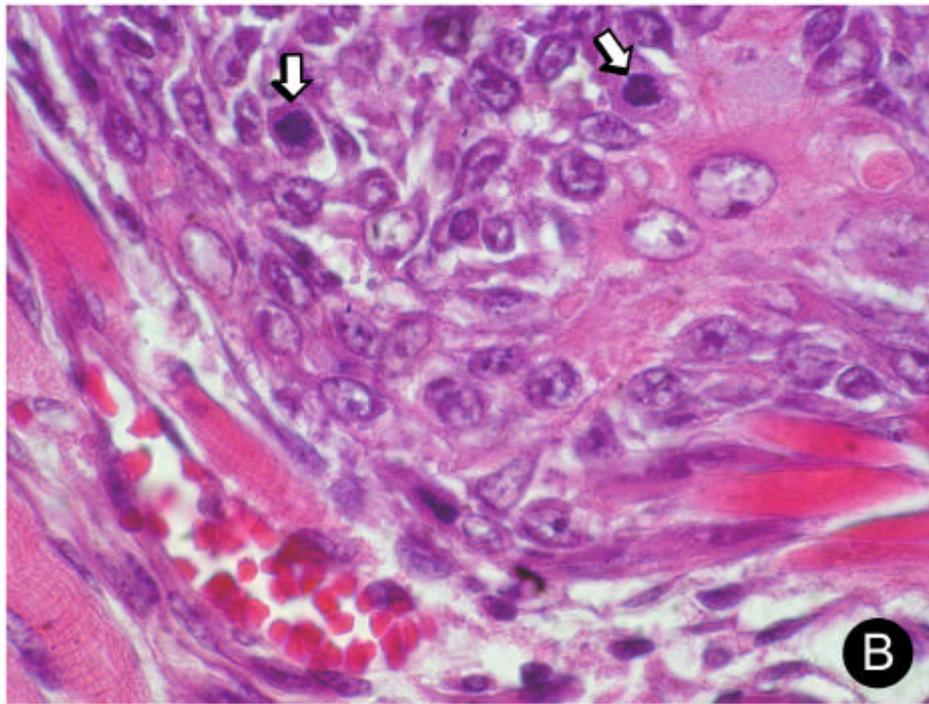
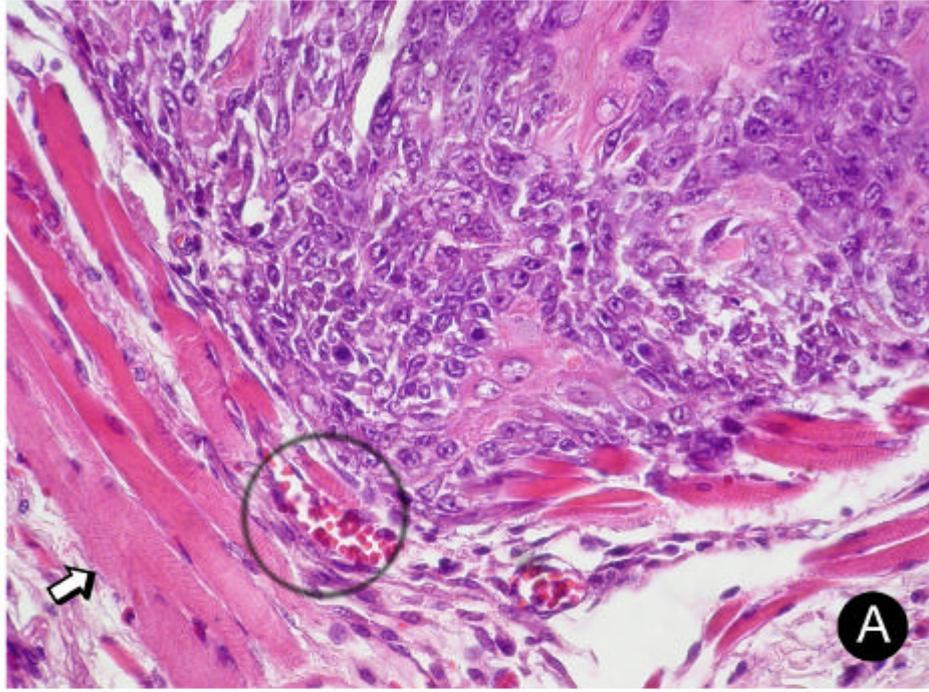


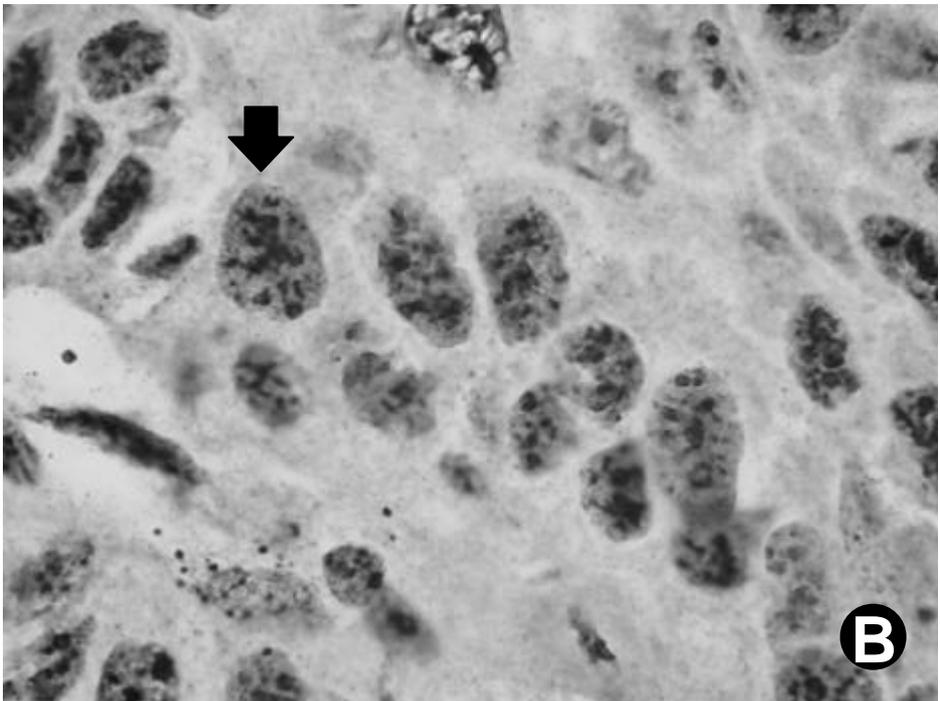
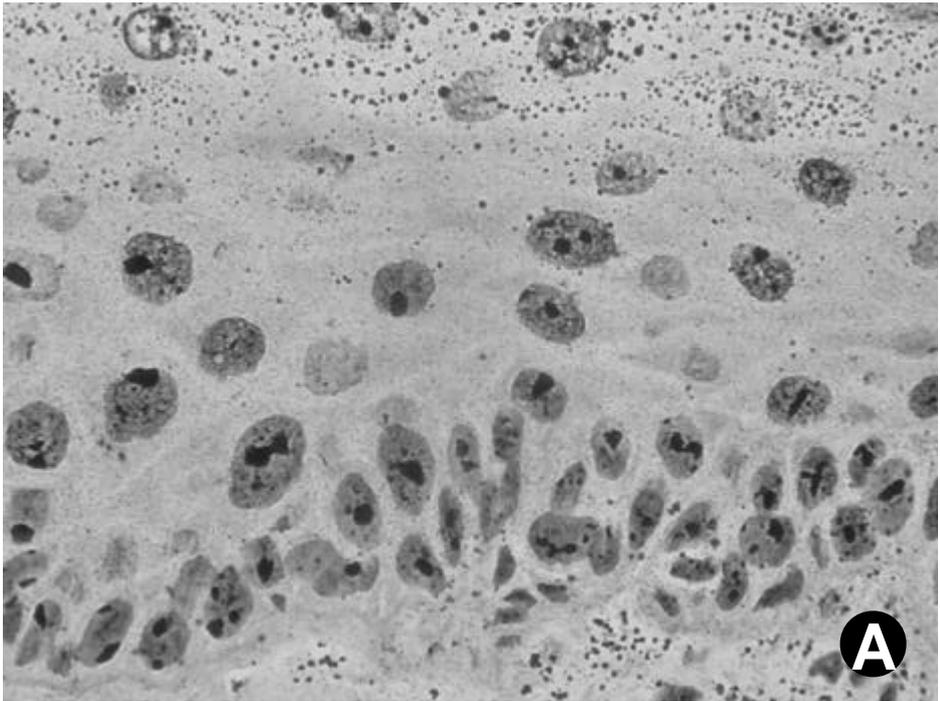












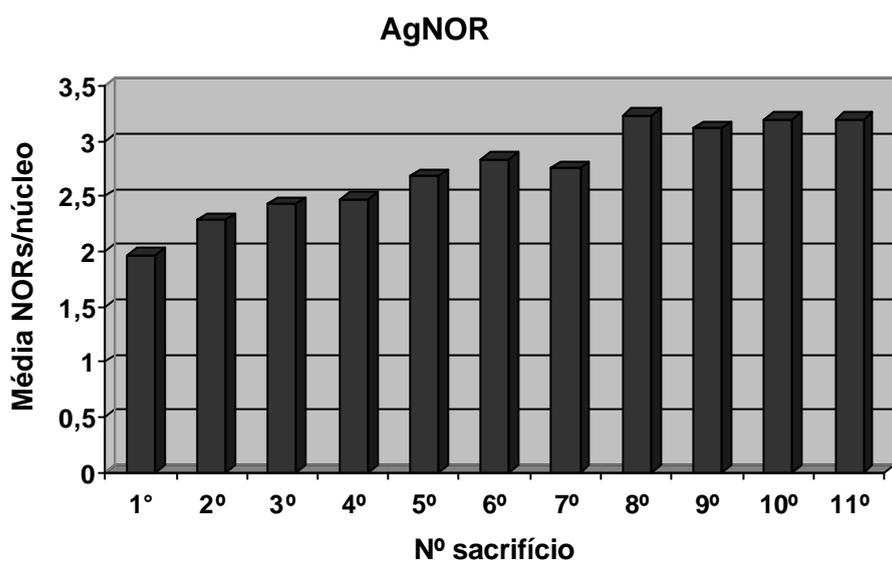


FIGURA 23 – média das NORs por período de sacrifício. Notar que a média torna-se superior a três a partir do oitavo sacrifício ou 18ª semana de aplicação do DMBA.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico do câncer em estágio inicial é necessário em virtude de nesta fase, ser possível a cura de praticamente todos os casos. Nos casos avançados de CE, a sintomatologia é bastante evidente que somente um profissional totalmente despreparado, deixaria de formular uma hipótese de câncer à primeira vista da lesão. Portanto, o conhecimento adequado das primeiras manifestações clínicas da doença, o exame bucal metódico e sistemático, visando a sua detecção e o uso correto de exames complementares, constitui-se pedra angular do diagnóstico precoce do câncer (TOMMASI⁸⁷, 2002).

Fielding et al.³⁵ (1992) publicaram um artigo de revisão sobre o futuro dos fatores de prognóstico para os pacientes com câncer. Os autores afirmaram que a descrição anatômica da extensão da neoplasia permite o manejo clínico, facilita a comunicação entre os profissionais e é parte essencial dos estudos clínicos conduzidos, permitindo também aconselhar pacientes e suas famílias. Para os autores, o sistema TNM deve continuar sendo utilizado como uma referência para a classificação dos pacientes, havendo ainda uma série de possibilidades de utilização de novos métodos para construir-se um índice de prognóstico, que possibilitará ainda melhor planejamento terapêutico e previsão de resultados dos tratamentos. Dentre esses métodos, consideram-se análises histológicas, marcadores biológicos neoplásicos e aprimoramento dos métodos estatísticos de análise dos resultados.

Modelos animais, principalmente os camundongos, ratos e hamsteres têm sido os mais utilizados para o melhor entendimento da etiologia, patogênese e terapia das mais variadas patologias, bem como o

estudo do carcinoma epidermóide que se desenvolve nas estruturas de revestimento bucal, auxiliando na compreensão da etiologia do câncer. (SALLEY⁷⁷, 1954; MORRIS⁵⁹, 1961; SHKLAR⁸⁴, 1972; FUJITA³⁹, 1973; MAREFAT & SHKLAR⁵⁷, 1977; EVENSON³², 1981; ODUKOYA & SHKLAR^{62,63}, 1982, 1984; FASSONI et al.³³, 1993; DAYAN²⁷, 1997; LIMA^{47,48}, 1997, 1999; KITAKAWA⁴⁵, 2002).

Uma das vantagens na utilização de hamsteres, conforme Kitakawa⁴⁵ (2002) é que os mesmos são animais dóceis, de manipulação e condicionamento fácil, passíveis de contenção física durante as aplicações, não necessitando do emprego de substâncias com propriedades sedativas e evitando assim a morte dos animais devido à toxicidade das drogas sedativas.

Nos hamsteres, dois sítios intrabucais têm sido mais utilizados no estudo da carcinogênese quimicamente induzida, um é a mucosa da bolsa da bochecha e outro a borda lateral da língua, observando-se que o primeiro foi preferido na maioria dos estudos experimentais (SALLEY⁷⁷, 1954; MORRIS⁵⁹, 1961; SHKLAR⁸⁴, 1972; ODUKOYA & SHKLAR⁶³, 1984; SCHWARTZ et al.⁷⁹, 2000). Uma das principais vantagens deste modelo em relação a outros locais intrabucais é a facilidade na indução do carcinoma, atribuída a uma menor espessura do epitélio e ao isolamento da bolsa da bochecha em relação a ação da saliva, conferindo um maior período de contato do carcinógeno no tecido (EVENSON³², 1981).

Porém, a principal crítica a este modelo está relacionada ao fato da bolsa jugal ser uma estrutura ausente na anatomia dos tecidos bucais humanos (EVENSON³², 1981; FASSONI et al.³³, 1993). Outra desvantagem é que a conformação anatômica dificultaria sobremaneira a análise dos aspectos clínicos apresentados pelas lesões.

Contudo, o modelo de carcinogênese em borda lateral de língua de hamsteres parece ser mais representativo, uma vez que além de manipulação e visualização mais fácil, língua é o local intrabucal de

maior acometimento de carcinoma epidermóide em humanos (SHKLAR⁸⁴, 1972; MAREFAT & SHKLAR⁵⁷, 1977; EVENSON³², 1981; FASSONI et al.³³, 1994).

No presente estudo, realizou-se a graduação de atipias segundo o critério de BANÓCZY & CSCIBA⁶ (1976) e do estágio de invasão dos casos segundo o critério de ANNEROTH et al.¹ (1987), por serem os métodos que apresentam maiores subsídios na literatura.

O epitélio do bordo lateral da língua dos hamsteres do grupo controle apresentou-se liso, brilhante e avermelhado, durante todo o experimento. Histologicamente manteve-se do tipo pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, sendo sua espessura de cinco a sete células e a camada de ortoqueratina bem fina. A lâmina própria era representada por estreita faixa de tecido conjuntivo frouxo, pouco celularizado, com poucos vasos sanguíneos, ausência de infiltrado inflamatório e a submucosa exibia grande quantidade de tecido muscular estriado esquelético. As pequenas áreas de alterações histológicas observadas na camada basal estão dentro das variações consideradas normais em epitélio que sofre renovação constante.

Devido à discreta presença da duplicação, hipercromatismo e perda de polaridade das células da camada basal, tanto nos animais do grupo controle como no primeiro sacrifício do grupo estudo (quarta semana de aplicação), estes achados isoladamente, ou em conjunto, não foram levados em consideração quando da gradação de atipia, acatando os mesmos somente quando aumentaram sua expressão, o que ocorreu nos sacrifícios seguintes dos grupos estudos.

Nossos resultados demonstraram que as alterações, observadas clinicamente no grupo sujeito à aplicação de DMBA, puderam ser descritas como: epitélio esbranquiçado, áspero e com perda do brilho; áreas eritematosas associadas a áreas esbranquiçadas; pápulas; placa; papilomatose; e nódulo; podendo estes quatro últimos conter ou não áreas eritematosas em sua superfície. Deve ser ressaltado que as

mesmas desenvolveram-se praticamente na seqüência apresentada durante o experimento e foram utilizadas como critérios macroscópicos na seleção dos animais a serem sacrificados.

Destarte, os achados histológicos encontraram-se em paralelismo com aqueles aspectos macroscópicos, os quais interpretamos como pertinentes às expressões clínicas do desenvolvimento do carcinoma em bordo de língua dos hamsteres.

As primeiras manifestações de atipias celulares no epitélio foram notadas na região de transição da borda lateral com o assoalho bucal, bem como a maioria das lesões surgiu nesta área, devendo ser observado que a área em questão mantém contato com o dente molar inferior de forma natural e fisiológica, possibilitando uma ação coadjuvante na indução de neoplasias malignas quando na presença de um carcinógeno.

Trabalhos mais antigos empregavam trauma na região, acreditando que funcionaria como facilitador no acesso dos carcinógenos junto às células germinativas do epitélio, criando portas de entrada para a ação dos mesmos (FUJITA³⁹, 1973).

Observamos que nas áreas clinicamente esbranquiçadas, havia aumento da espessura da queratina, ora se expressando como hiperortoqueratose, ora como hiperparaqueratose. Nas áreas clinicamente eritematosas, ocorreu o contrário: houve diminuição da camada de queratina, muitas vezes se expressando como paraqueratose, ou até mesmo, ausência da mesma.

Esta diminuição ou falta de queratinização, especialmente quando combinada com o adelgaçamento epitelial, permite que a microvasculatura subjacente se mostre, daí a coloração avermelhada (NEVILLE⁶¹ et al., 1995).

A acantose e hiperortoqueratina foram observadas já no primeiro sacrifício, ou quarta semana de aplicação da droga, e, persistindo em todos os sacrifícios subseqüentes. Neste mesmo período, um animal

apresentou atipia leve, decorrente do aumento do volume nuclear. A média do número de NORs, 1,97/núcleo esteve dentro dos parâmetros de normalidade.

Os achados presentes a partir do segundo sacrifício, ou sexta semana de aplicação, foram hiperplasia dos cones epiteliais, espongirose e queratinização individual de células. Um animal apresentava atipia epitelial leve, sendo de 2,28 a média do número de NORs/núcleo, achados estes que se relacionaram clinicamente com áreas esbranquiçadas.

O achado presente a partir do terceiro sacrifício, ou oitava semana, foi a presença de áreas paraqueratinizadas; com a acantose e hiperplasia dos cones epiteliais perpetrando em 60% deles. Um animal apresentou atipia leve e dois atipia moderada. A média do número de NORs/núcleo nos animais era de 2,43. O aspecto clínico observado de lesões semelhantes a eritroleucoplasia correspondeu aos achados histopatológicos.

Importante salientar que a hiperparaqueratose e paraqueratose estava, na maioria das vezes, presente nas áreas em que o grau de atipia tornava-se mais expressivo. Este fato também foi observado por Kitakawa⁴⁵ (2003), e concordamos quando sugere que este tipo de alteração é um indicativo de mudança no processo de maturação das células epiteliais, podendo ser utilizado como um indicador histopatológico dos estágios iniciais de transformação maligna.

Na décima semana de aplicação, ou quarto sacrifício, pode ser notado maior expressão do hiperchromatismo, ocorrendo pela primeira vez perda da estratificação epitelial, crescimentos epiteliais exofíticos, áreas de atrofia, figuras mitóticas aumentadas, nucléolos aumentados e de pleomorfismo celular e nuclear. Dois animais apresentaram atipia leve, dois atipia moderada e um carcinoma epidermóide superficialmente invasivo. A média de NORs/núcleo nos animais foi de 2,47. Do ponto de

vista clínico apresentaram lesões semelhantes a leucoplasia homogênea em 80% dos animais e lesões nodulares eritroleucoplásicas em 40%.

Assim, conforme os achados da histologia e das NORs, somados às características clínicas, apesar da pequena amostragem, ficou claro que na décima semana de aplicação do DMBA, o fenômeno da carcinogênese induzida quimicamente em bordo lingual dos hamsteres transcendeu a fase de promoção e encontrou-se em franca progressão, segundo os parâmetros preconizados por (BERENBLUN⁸, 1964 citado por BARROS⁷, 1999; ODUKOYA & SHKLAR⁶³, 1984; FRANKS³⁷, 1990; PITOT⁶⁹, 1993; FASSONI et al.³³, 1993; BRASIL¹⁴, 1996; ROBBINS et al.⁷⁴, 1996; MAGALHÃES & MAGALHÃES⁵⁵, 2002).

Na décima segunda semana de aplicação, ou quinto sacrifício, houve maior expressão de paraqueratinização, que ocorreu em todos os animais. Manifestou-se pela primeira vez a acantólise. Neste grupo quatro animais tinham atipia moderada e um apresentava carcinoma superficialmente invasivo. A média no número de NORs/núcleo estava em 2,67. As alterações clínicas observadas foram relativamente monótonas com formação de pápulas esbranquiçadas de permeio a áreas eritematosas, tendo um animal lesão papilomatosa com superfície eritroleucoplásica.

A análise das áreas acantolíticas focais na camada espinhosa do epitélio ocorreu, em média, em 52% dos animais a partir da 12ª semana, por vezes distante da alteração observada clinicamente e do local de aplicação da droga (ventre lingual, dorso e borda lateral do lado oposto), geralmente associada a presença de paraqueratina na superfície. Nestes focos, as células perderam a aderência entre si e apresentaram aspecto de queratinização individual. Esta perda de coesão celular levou a formação de fendas intraepiteliais, porém não se observou, clinicamente, formação de bolhas ou vesículas. Este fenômeno talvez expresse uma forma de apoptose de células iniciadas, nas quais o rearranjo do sistema de reparo do DNA não permitiu a viabilidade das mesmas (LOURO⁵²,

2002). Este fenômeno deve ser melhor avaliado no processo da carcinogênese.

Na décima quarta semana, ou sexto sacrifício, os animais começaram a expressar perda de coesão celular. Houve maior expressão do pleomorfismo celular e nuclear. Concluiu-se que um animal tinha atipia moderada, um atipia severa, um carcinoma *in situ* e dois carcinoma superficialmente invasivo. A média do número de NORs/núcleo foi de 2,83. O aspecto clínico que chamou atenção foi de que os dois animais que apresentaram pápulas em regiões eritroleucoplásicas eram os que tinham carcinomas superficialmente invasivos, em sintonia com WHO⁹² (1978), Neville et al.⁶¹ (1995), Pindborg⁶⁷ (1997), Jordan & Daley⁴² (1997) que consideram as eritroleucoplasias como áreas com maior probabilidade de carcinoma subjacente.

No sétimo sacrifício, ou décima sexta semana de aplicação, houve maior expressão da espongirose e apareceram pela primeira vez microabscessos. A média do número de NOR/núcleo foi de 2,75. Um animal manifestou atipia leve, um atipia moderada, um atipia severa, um carcinoma *in situ*, e um carcinoma invasivo. Os aspectos clínicos observados foram de lesões semelhantes a placas eritroleucoplásicas com pápulas e papilomatose na superfície.

No oitavo sacrifício, ou 18ª semana de aplicação, bem como nos períodos subseqüentes, houve aumento da expressão dos achados histológicos de forma que, em média, mais de 95% dos animais apresentaram carcinomas. Em todos estes grupos a média do número de NOR/núcleo foi acima de 3,11 caracterizando prevalência do padrão mitótico. As alterações clínicas que prevaleceram caracterizaram um quadro à semelhança de placa eritroleucoplásica contendo pápulas, ora manifestando lesões nodulares, ora papilomatosas, ambas com áreas eritroleucoplásicas em sua superfície.

Quando avaliamos individualmente as variáveis histológicas que fazem parte do critério proposto por BANÓCZY & CSIBA (1976) e

aquelas propostas por ANNEROTH et al.¹ (1987), houve aumento da intensidade e freqüência das atipias proporcionalmente ao tempo do experimento.

O reduzido número de diagnóstico de carcinomas *in situ* encontrado em nosso material pode ser devido a um curto período de transição do carcinoma *in situ* para um carcinoma invasivo, como considera Shafer⁸² (1975) ou ao fato dessa alteração constituir áreas focais nem sempre detectadas histologicamente.

O estroma apresentava-se, via de regra, mais celularizado e com infiltrado inflamatório mais intenso à medida que caminhava para um pior prognóstico.

Nossos resultados, através da contagem das NORs, corroboram com aqueles observados por Crocker²⁴ (1996) e Kitakawa⁴⁵ (2002), cujas NORs presentes nas atipias epiteliais puderam ser facilmente distintas numericamente e morfológicamente das NORs presentes nos carcinomas epidermóides com padrão histológico mais invasivo.

Em nosso trabalho pudemos encontrar relação direta entre o tempo de aplicação do DMBA e as alterações clínicas e histopatológicas decorrentes da aplicação do carcinógeno. Os poucos animais que não acompanharam a ordem crescente de aparecimento das alterações clínicas e histológicas observadas, talvez, estejam condicionados a fatores individuais relacionados com a resistência à carcinogênese (SCULLY & FIELD⁸¹, 1997 citado por BARROS⁷, 1999; JORDAN & DALLEY⁴², 1997), Sherr⁸⁴ (1996) relatou que as variáveis clínicas e histopatológicas da neoplasia, bem como a resposta imune do paciente, vêm justificar as diferenças no comportamento evolutivo da doença, possivelmente relacionada a características genéticas.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos da análise dos aspectos clínicos, histológicos e da contagem das NORs durante o processo de carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em bordo lateral da língua de hamsteres, podemos concluir que:

- a) as lesões pertinentes à carcinogênese induzida pelo DMBA em bordo lateral de língua de hamsteres guardam semelhança com aquelas contidas na literatura no que se refere ao desenvolvimento do carcinoma em humanos;
- b) não obstante às peculiaridades clínicas e histológicas da língua dos hamsteres, existe sintonia entre as lesões supra citadas e seus respectivos quadros histológicos, se comparados aos fenômenos considerados na carcinogênese em humanos;
- c) o emprego da AgNOR no estudo da carcinogênese induzida quimicamente em bordo lingual de hamsteres, mostrou paralelismo perante às expressões clínicas e histológicas dos carcinomas instalados condizendo, assim, com sua característica de marcador da proliferação celular;
- d) fato peculiar no hamster é o posicionamento de seu molar inferior, o qual pode, mesmo em função fisiológica, ser considerado coadjuvante da carcinogênese induzida quimicamente em bordo lingual dos mesmos.

8 REFERÊNCIAS*

- | | |
|---|---|
| 1 | ANNEROOTH, G.; BATSKIS, J.G.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. Scand J Dent Res , v.95, n.3, p.229-49, June, 1987. |
| 2 | ARAUJO, N.S.; ARAUJO, V.C. Patologia bucal . São Paulo: Artes Médicas, 1984. 239p. |
| 3 | ARTHUR, J.F.; FENNER, M.L. The influence of histological grading on prognosis in carcinoma of the tongue: a computer analysis of 299 cases. Clin Radiol , v.17, n.4, p.384-96, Oct. 1966 apud DIB, L.L. Carcinoma espinocleular de língua: análise dos dados clínicos, sociodemográficos e fatores de prognóstico . Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997. |
| 4 | BALASUBRAMANIAN, S.; ELANGO VAN, V.; GOVINDASAMY, S. Fluorescence spectroscopic identification of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Carcinogenesis , v.16, p.2461-5, 1995 apud CHEN, C.TT et al. Autofluorescence in normal and malignant human oral tissues and in DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. J Oral Pathol Med ,v.27, p.470-4, 1998. |
| 5 | BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. Theory and practice of histological techniques . 4.ed. Churchill Livingstone, 1996. |
| 6 | BANÓCZY, 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, p.766-4, 1976. |
| 7 | BARROS, R.M.G. Análise crítica da utilização do método de detecção das NORs (AgNOR) na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca . 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) - Convênio Interinstitucional USP/UFMS, São Paulo, 1999. |
| 8 | BERENBLUM, I. The two - stapes mechanism of carcinogenesis as analytical tool. In: _____. The cellular control mechanisms and cancer . London: Elsevier, 1964. cap. 2, p.35-47 apud BARROS, R.M.G. Análise crítica |

da utilização do método de detecção das NORs (AgNOR) na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca. 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) - Convênio Interinstitucional USP/UFMS, São Paulo, 1999.

9 BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogeneses. **Cell**, v.64, n.2, p.235-48, Jan. 1991

10 BLOT, W. J. Alcohol and cancer. **Cancer Res**, v.52, n.1, p.2119s-23s, Apr. 1992.

11 BONNE, C. Sur la présence de papillomes sur les muqueuses d'animaux badigeonnées au goudron. **Comptes Rendus Société de Biologie**, v.93, p.907, 1925 apud EVENSON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. **J Oral Pathol**, v.10, p.129-46, 1981.

12 BOSSO, R.MV.; FROES, N.D.T. Origem das mutações. In: LOURO, I.D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. Cap. 2, p.25-30.

13 BOYLE, J.O. et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Surg**, v.168, n.5, p.429-32, Nov. 1994.

14 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Como é o processo da carcinogênese**. 1996. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/carcinogenese> e <http://www.inca.gov.br/cancer/agentes>>. Acesso em: 20 jan.2004.

15 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Manual de detecção de lesões suspeitas: câncer de boca**. Brasília. 1996. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/manual/boca/.html>> via the internet. Acesso em: 26 maio 2000.

16 BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGIOLO, L. Distúrbio do crescimento e da diferenciação celular. In BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia bucal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap 8, p.148-92.

17 BRODERS, A.C. Carcinoma of the mouth: types and degrees of malignancy. **AJR J Am Roentgenol**, v.17, n.1, p.90-93, Jan.1927

18 BRODERS, A.C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin N Am**, v.21, n.4, p.947-62, Aug. 1941 apud ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in

oral squamous cell carcinomas. **Scan J Dent Res**, v.95, n.3, p.229-49, 1987.

19	CADE, S.; LEE, E.S. Cancer of the tongue: a study based on 653 patients. Br J Surg , v.44, n.187, p.433-46, Mar. 1957
20	CHAUDHRY, A.P. et al. Comparison of citologic and histologic findings in induced carcinoma. J Dent Res , v. 46, n.1, p253-6. Jan/Feb, 1967 apud FASSONI, A.A.; SALLES, C.L.F.; CONSOLARO, A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. Rev Odontol USP , v.7, n.4, p.285-91, out./dez. 1993.
21	CHEN, C.TT et al. Autofluorescence in normal and malignant human oral tissues and in DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. J Oral Pathol Med ,v.27, p.470-4, 1998.
22	CHUNG, K.Y. et al. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Res , v.53, n.7, p.1676-83, Apr. 1993.
23	COPPER, M.P. et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg , v. 121, n.2, p.157-60, Feb. 1995
24	CROCKER, J. Molecular and biochemical aspects of interphase nuclear organiser regions. Clin Mol Pathol , v.49, n.1, p.8M-11M, Feb. 1996.
25	CROCKER, J.; SKILBECK, N. Nucleolar organizer region associated proteins in melanotic lesions: a quantitative study. J Clin Pathol , v.40, n.8, p.885-9, Aug. 1987.
26	CRUZ, I.B. et al. Age: dependence of human papiloma virus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. Eur J Cancer B Oral Oncol , v.32B, n.1, p.55-62, Jan.1996.
27	DAYAN, D. et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. Eur J Cancer B Oral Oncol , v.33, p.105-9, 1997.
28	DERENZINI, M. The AgNORs. Micron , v.31, p.117-20, 2000.
29	DIB, L.L. et al. Determinantes de sobrevida em câncer de boca: fatores sócio-demográficos e anatômicos. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço , v.14, n.1-3, p.1-9, jan./dez. 1990.
30	DIB, L.L. Fatores Prognósticos em carcinoma espinocelular de

língua: análise clínica e histopatológica. São Paulo, 1991. 146p. Trabalho (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

31	DIB, L.L. Carcinoma espinocleular de língua: análise dos dados clínicos, sociodemográficos e fatores de prognóstico. 1997. 150f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
32	EVENSON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. J Oral Pathol , v.10, p.129-46, 1981.
33	FASSONI, A.A.; SALLES, C.L.F.; CONSOLARO, A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. Rev Odontol USP , v.7, n.4, p.285-91, out./dez. 1993.
34	FIELD, J.K. et al. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg , v.119, n.10, p.1118-22, Oct. 1993
35	FIELDING, L.P.; FENOGLIO-PREISER, C.M.; FREEDMAN, L.S. The future of prognostic factors in outcome prediction for patients with cancer. Cancer , v.70, n.9, p.2367-77, Nov. 1992.
36	FRANCO, E.L. et al. Risk factors for oral câncer in Brasil. Int J Cancer , v. 43, n.6, p. 992-1000, June 1989.
37	FRANKS, L.M. O que é câncer. In: FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. Introdução à biologia celular e molecular do câncer. Trad. M.M. Brentani; R. Chamas. São Paulo: Roca, 1990. Cap.1, p.1-24.
38	FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. Glossário. In: _____. Introdução à biologia celular e molecular do câncer. Trad. M.M. Brentani; R. Chamas. São Paulo: Roca, 1990. p.405-23.
39	FUJITA, K. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site of formation. J Dent Res , v.52, n.6, p. 1177-85, 1973.
40	HABER, D.A.; FEARON, E.R. The promise of cancer genetics. Lancet , v.351, p.1-8, May 1998 apud BARROS, R.M.G. Análise crítica da utilização do método de detecção das NORs (AgNOR) na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca. 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) - Convênio Interinstitucional USP/UFMS, São Paulo, 1999.

- | | |
|----|--|
| 41 | HSU, T.C. Alcohol: a carcinogen in head and neck malignancies. The biology and prevention of aerodigestive tract cancers , p.35-7, 1992 apud LIMA, N.L. Estudo das alterações morfológicas na carcinogênese química bucal comparando-se a indução pelo DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor . 1997. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Estomatologia) - Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. |
| 42 | JORDAN, R.C.; DALEY, T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. J Can Dent Assoc , v.63, n.7, p.517-25, July/Aug. 1997. |
| 43 | JOVANOVIC, A. et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med , v.22, p.459-62, 1993. |
| 44 | KERAWALA, C.J. Oral cancer, smoking, and alcohol: the patients' perspective. Br J Oral Maxillo Facial Sug , v.37, p.374-6 1999. |
| 45 | KITAKAWA, D. Utilização do AgNOR no processo de carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em borda lateral de língua de hamster sírio dourado . 2003,131f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2003. |
| 46 | KRUTCHKOFF, K.J. et al. Oral cancer: a survey of 566 cases from the University of Connecticut Oral Pathology Biopsy Service, 1975-1986. Oral Surg Oral Med Oral Pathol , v.70, n.2, p.192-8, Aug. 1990. |
| 47 | LIMA, N. L. Estudo das alterações morfológicas na carcinogênese bucal comparando-se a indução pelo DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor . 1997. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Estomatologia) - Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. |
| 48 | LIMA, N. L. Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal . 1999. 104p. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999. |
| 49 | LIN, L.M. et al. Minimal arecaidine concentrations showing a promotion effect during DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. J Oral Pathol Med , v.25, p.65-8, 1996. |
| 50 | LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. Quim Nova , v.25, n.5, p.777-93, 2002. |

- | | |
|----|---|
| 51 | LOURO, I.D. Proto-oncogenes e genes supressores de tumor. In: LOURO, I.D. et al. Genética molecular do câncer . 2.ed. São Paulo: MSG Produção, 2002. Cap.6, p.63-79. |
| 52 | LOURO, I.D. Apoptose. In: LOURO, I.D. et al. Genética molecular do câncer . 2.ed. São Paulo: MSG Produção, 2002. Cap.8, p.63-79. |
| 53 | LUPULESCU, A. The role of vitamins A, [beta]-carotene, E and C in cancer cell biology. Int j Vitam Nutr Res , v.64, p.3-14, 1994 apud LUPULESCU, A. Review: control of precancer cell transformation into cancer cell: its relevance to cancer prevention. Cancer Detec Prev , v.20, n.6, p.634-47, 1996. |
| 54 | LUPULESCU, A. Review: control of precancer cell transformation into cancer cell: its relevance to cancer prevention. Cancer Detec Prev , v.20, n.6, p.634-47, 1996. |
| 55 | MAGALHÃES, R.P.; MAGALHÃES, M.H.C.G. Carcinógenos bucais. In: PARISE JUNIOR, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos . São Paulo: Sarvier, 2000. Cap. 3, p.16-22. |
| 56 | MANAHAN, S.E. Organic chemistry. In: _____. Fundamentals of environmental chemistry . Lewis, 1993. |
| 57 | MAREFAT, P. SHKLAR, G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. Oral Surg v.44, n.4, p.578-86, Oct. 1977. |
| 58 | McMILLAN, M.D., SMILLIE, A.C. Scanning electron microscopy of dimethylbenzanthracene (DMBA)-treated hamster cheek pouch. J Oral Pathol Med , v.25, p.14-9, 1996. |
| 59 | MORRIS, A.L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. J Dent Res , v.40, n.1, p.3-15, 1961. |
| 60 | MILLER, C.S.; WHITE, D.K.; KY, L. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of literature. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod , v.82, n.1, p.57-68, July 1996. |
| 61 | NEVILLE, B.W. et al. Patologia Epitelial. In: _____. Patologia Oral Maxilofacial , Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro., 1995. Cap 10, p.252-313. |
| 62 | ODUKOYA, O.; SHKLAR, G. Two-phase carcinogenesis in hamster buccal pouch. Oral Surg Oral Med Oral Pathol , v.54, n.5, p.547-52, Nov. 1982. |

63	ODUKOYA, O.; SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. Oral Surg , v.58, n.3, p.315-20, Sept. 1984.
64	O'NEILL, P. Hazardous organic compounds. In: _____. Enviromental chemistry . 2.ed. London: Chapman & Hall, 1995. Cap. 17, p.230-39.
65	ONIZAWA, K. et al. Factors associated with diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol , v.39, p.781-8, 2003.
66	PARISI JUNIOR, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos . São Paulo: Sarvier, 2000.
67	PINDBORG, J.J. Câncer e pré-câncer bucal . São Paulo: Panamericana, 1981. 189p.
68	PINTO, D.S.; CAVALARI, M.C. Epidemiologia do câncer da boca. In: TOMMASI, A.F. Diagnóstico em patologia bucal . 3.ed. São Paulo: Pancast, 2002. Cap. 24, p. 391-406.
69	PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. Cancer , v.72, n.3, p.962-70, Aug. 1993.
70	PRINCE, S.; BAILEY, B.M.W. Squamous carcinoma of the tongue: review Br J Oral Maxillo Facial Sug , v.37, p.164-74, 1999.
71	RAPIDIS, A.D. et al. TNMP: a new system for the clinico-pathological classification and identification of intra-oral carcinomata. Cancer , v.39, n.1, p.204-9, Jan. 1977.
72	REDMAN, R.S.; KRASNOW, S.H.; SNIFFEN, R.A. Evaluation of carcinogenic potential of toluidine blue O in the hamster cheek pouch. Oral Surg Oral Med Oral Pathol , v.74, n.4, p.473-80, Oct. 1992.
73	REIS, S.R.R. et al. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe II. (Dieta alimentar). Rev Pos-Grad , v.4, n.3, p.186-90, jul./set. 1997.
74	ROBBINS, S. L. et al. Neoplasias. In: _____. Patologia estrutural e funcional . 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 7, p.213-368.
75	RUBRIGHT, W.X. et al. Risk factors for advanced-stage oral cavity câncer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg , v.122, n.6, p.621-6, June 1996
76	SALISBURY, P.L. Diagnosis and patient management of oral cancer. Dent

Clin North Am, v.41, n.4, p.891-914, Oct. 1997.

77	SALLEY, J.J. Experimental carcinogenesis in cheek pouch of the Syrian hamster. J Den Res , v.34, n.5, p.253-62, 1954.

78	SANKARANARANYANAN, R. Oral cancer in India: An epidemiologic and clinical review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol , v.69, n.3, p.325-330, Mar. 1990.

79	SCHWARTZ, J.L. et al. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancer at two anatomic sites. Oral Oncology , v.36, p.225-35, 2000.

80	SCHWINT, A.E. et al. AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. J Oral Pathol Med , v.25, n.1, p.20-4, 1996.

81	SCULLY, C.; FIELD, J. Genetic aberrations in squamous cell carcinoma of the head and neck with reference to oral. Int J Oncol , v.10, n.6, p. 8-21, July 1997 apud BARROS, R.M.G. Análise crítica da utilização do método de detecção das NORs (AgNOR) na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca . 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) - Convênio Interinstitucional USP/UFMS, São Paulo, 1999.

82	SHAFFER, W.G. Oral carcinoma in situ. Oral Surg , v.39, n.2, p.227-238, 1975.

83	SHEARER, B.H.; MCMILLAN, M.D.; JENKINSON, H.F. Differential expression of type I cytokeratins in hamster cheek pouch epithelium following treatment with dimethylbenzanthracene. J Oral Pathol Med , v.26, p.470-6, 1997.

84	SHERR, C.J. Cancer cell cycles. Science , v.274, n.5293, p.1672-7, Dec. 1996.

85	SHKLAR, G. Experimental oral pathology In the Syrian Hamsters. Prog Exp Tumor Res , v.16, p.518-38, 1972.

86	SILVERMAN JUNIOR, S. Early diagnosis of oral cancer. Cancer v.62, n.8, p.1796-9, 1988.

87	TOMMASI, A.F. Semiologia do câncer bucal. In: _____. Diagnóstico em patologia bucal . 3.ed. São Paulo: Pancast, 2002. Cap. 25, p.407-40.

- | | |
|----|---|
| 88 | TOMMASI, A.F.; GARRAFA, V. Câncer Bucal . São Paulo: Medisa, 1980. 814p. |
| 89 | VECCHIA, C.; TAVANI, A.; LEVI, F. Epidemiology and prevention of oral cancer. Oral Oncol , v.433, n.5, p.302-12, Sept. 1997. |
| 90 | WANG, C.Y. et al. Autofluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of DMBA-induced hamster buccal pouch pre-cancers and cancers. J Oral Pathol Med , v.32, p.18-24, 2003. |
| 91 | WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for Europe. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: _____. Air Quality Guidelines . 2.ed. Copenhagen: WHO, 2000. Chap. 4.9, p.1-24. |
| 92 | WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg , v.46, n.4 p.518-39, Oct. 1978. (Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions) |
| 93 | WILLIAMS, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. Toxicology , v.166, p.3-10, 2001. |

Anexo A - Declaração do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

MONTEIRO, A.D. **Comparative study between clinical, histological aspects and the nuclear argyrophilic nuclear organizer region impregnated by silver (AgNOR) in the evolution of epidermóide carcinoma induced chemically by 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) on the tongue of golden sirian hamsters.** 2004. 116f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2004.

ABSTRACT

In this work were studied, comparatively, the clinical, histological and nuclear argyrophilic nuclear organizer region impregnated by silver (AgNOR) aspects in the carcinogenesis on the tongue of golden syrian hamster (*Mesocricetus Auratus*), induced chemically by 0,5% 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) in acetone. Eighty eight hamsters were divided into two groups: 55 in the study group, were painted three times a week on left side of the tongue with DMBA solution and 33 in the control group were painted only with acetone, with the same frequency. The results consent the followed conclusions: the clinical aspects of the evolution of epidermoid carcinoma (EC) in carcinogenesis induced chemically by DMBA on the tongue hamster were similar with that in the literature about the development of the EC in humans; there is connection between the clinical and histological aspects when compared with the humans carcinogenesis; the AgNOR show compatibility with malignant histological changes, validating in being proliferation marker and, finally, the position of hamster molar tooth can be considerate an adjuvant in the carcinogenesis induced chemically on the hamster tongue.

KEYWORDS: 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, DMBA; silver staining, AgNOR; carcinoma, squamous cell, oral; carcinoma, chemically induced.

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

André Destéfani Monteiro

SJC, 05/09/2004