

LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA



**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NUCLEAR DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA), DA β -CATENINA
E DO AgNOR, NA ETAPA INICIAL DO PROCESSO DE
CARCINOGÊNESE QUIMICAMENTE INDUZIDO PELO
DMBA, EM BORDA LATERAL DE LÍNGUA DE
HAMSTERS SÍRIO DOURADO (*Mesocricetus auratus*)**

Tese de Livre-Docência apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Professor Adjunto.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

2006

TD792
R712
t1815

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI AB; SILVA EA. **Manual para elaboração de monografias:** estruturas do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002, 82p.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA), DA β -CATENINA E DO AgNOR, NA ETAPA INICIAL DO PROCESSO DE CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDO PELO DMBA, EM BORDA LATERAL DE LÍNGUA DE HAMSTERS SÍRIO DOURADO (*Mesocricetus auratus*). 2006, 104 f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2004.

DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS

*".....nos caminhos da vida, cada passo tem sua sutil
importância....."*

(Eiji Yoshikawa, 1935)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Sant'Ánna Rosa e Neusa Blumer Rosa (in memoriam), por todo carinho e apoio nesses longos anos de convívio, ser seu filho tem sido um aprendizado e uma benção para mim, aos meus pais meu muito obrigado.

À Ivani Therezinha de Jesus Camargo, companheira, parceira, amiga, em quem meu pai encontra apoio e carinho para uma velhice tranqüila.

A Caroline e Bruno Luiz, queridos e amados filhos, que mesmo distante possa ser um pai que lhes dê orgulho e que seja sempre um amigo, um Norte, durante nossa longa caminhada neste mundo.

Amo muito vocês!

*A Angela Bolanho, querida companheira,
adorável cúmplice nesses anos de pura
magia, minha alma gêmea. Obrigado
pelos momentos de compreensão,
paciência, amor e dedicação.*

Te adoro!!!!

*Ao Senhor Eideval Bolanho, Sra. Zélia
Maria Bolanho e a Anamaria Bolanho,
por me permitirem partilha e, reviver
momentos especiais em família,
obrigado.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho,

Durante esses 20 anos de carreira acadêmica, conheci muitas pessoas, convivi com vários docentes e pesquisadores, atravessei o Atlântico, conheci inúmeros pesquisadores de terras distantes, Alemanha, Coréia, China, Rússia, Croácia, América, enfim de diferentes nacionalidades, costumes, religiões e credos. No entanto, trago comigo com imenso orgulho, a figura desta professora dedicada e pessoa de retidão de caráter, exemplo a ser seguido por todos, que sempre nos aponta o caminho sério e por vezes árduo da pesquisa a percorrer na vida acadêmica. É muito bom poder compartilhar de seus ensinamentos.



À Professora Adjunta Rosilene Fernandes da Rocha,

Docente da Disciplina de Patologia Geral e da Disciplina de Farmacologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, atual Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal da FOSJC-UNESP, minha especial admiração pela sua pessoa, que vêm desempenhando e conduzindo de maneira exemplar todas as atividades e funções a ela atribuídas. Coração de "mãezona", sempre disponível, ajudando àqueles que a procuram, levando uma palavra de ajuda, e às vezes um puxão de orelha. Também tem sido muito bom poder compartilhar de seus ensinamentos.

***À Professora Doutora Adriana Aigotti Haberbeck
Brandão,***

Docente da Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, atual professora orientadora cadastrada no Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal da FOSJC-UNESP, minha admiração pela sua pessoal. A profa. Adriana é pessoa muito querida entre nós, sempre auxiliando os alunos de graduação, bem como os alunos de pós-graduação. Gostaria de deixar de público meus agradecimentos pela sua contribuição, não somente nas leituras das lâminas de pesquisas, mas também pelas suas constantes contribuições, trocando sempre idéias acerca de novas possibilidades de pesquisa. Também tem sido muito bom poder compartilhar sua convivência e seus ensinamentos.

Aos meus orientados Mestres Elaine Dias do Carmo, Andresa Pereira da Costa e os Cirurgiões-Dentistas Fernando Augusto Cervantes Garcia de Sousa e Pietro Mainenti, meu reconhecimento pela capacidade e por toda ajuda recebida, meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

UNESP

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior, ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal e ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pelo apoio recebido para a realização do concurso de Livre-Docência.

As secretárias Terezinha de Fátima Arantes de Mello e Sílvia Scarpel, pelo auxílio, amizade e disponibilidade.

À Ana Lourdes da Silva Machado, técnica de apoio acadêmico; Antônio Domingos Sávio Barbosa M. de Vasconcelos e Lourival Jacob, funcionários do Biotério desta Faculdade, meu agradecimento pela colaboração durante a execução dos trabalhos de pesquisa animal.

Aos demais colegas do Programa de Biopatologia Bucal, aos funcionários desta Faculdade de Odontologia e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho de pesquisa.

USP

As secretárias Néia, Zilda e Nair pelo carinho e amizade, durante estes longos anos de convívio.

À Sra. Edna Toddai e Elisa Santos, técnicas do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela ajuda na confecção do material utilizado nesta pesquisa.

Aos colegas da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP na pessoa da Vice-Diretora Susana Catanhede Orsini Machado de Souza, dos Professores Marina Helena C.G. de Magalhães, Marília T. Martins, Andréa Mantesso, Karen Lopez Ortega, Fábio Daumas Nunes e Décio dos Santos Pinto Júnior, meu agradecimento pela utilização dos vários anticorpos testados e utilizados, gentilmente cedidos pelo Laboratório Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
Carcinógenos e Carcinogênese.....	21
AgNOR.....	31
PCNA.....	34
β -Catenina.....	38
3 PROPOSIÇÃO.....	44
4 MATERIAL E MÉTODO.....	46
Análise imunoistoquímica.....	49
Análise histoquímica.....	52
Análise dos resultados.....	53
Análise estatística.....	54
Documentação fotográfica.....	55
5 RESULTADOS.....	56
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÕES.....	81
8 REFERÊNCIAS.....	83
ABSTRACT.....	100
ANEXO 1.....	101
ANEXO 2.....	102
ANEXO 3.....	103
AUTORIZAÇÃO.....	104

ROSA LEB. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA), DA β -CATENINA E DO AgNOR, NA ETAPA INICIAL DO PROCESSO DE CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDO PELO DMBA, EM BORDA LATERAL DE LÍNGUA DE HAMSTERS SÍRIO DOURADO (*Mesocricetus auratus*). 2006, 104f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

RESUMO

O modelo de câncer bucal em hamsters exhibe muitas semelhanças com o desenvolvimento do câncer oral em humanos. A capacidade proliferativa é uma das principais características das células neoplásicas e a detecção de células proliferativas permite, através de sua contagem, obter uma estimativa das taxas de crescimento neoplásico, com conseqüente repercussão no prognóstico e no tratamento das lesões. Foram utilizados 40 hamsters Sírios dourados, machos e fêmeos, com peso aproximado de 150 gramas, com dois a seis meses de idade. A seguir, foi aplicada solução de DMBA na borda lateral esquerda da língua dos animais por oito semanas. Os animais foram sacrificados, e as línguas removidas foram fixadas em formol tamponado a 10%. O cortes histológicos foram corados pela prata para marcação das NOR e pelos anticorpos PCNA e β -catenina. Os dados obtidos receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA e teste de Tukey. Após análise dos resultados pudemos concluir que as associações da técnica pelo AgNOR e a imunoistoquímica pelo PCNA refletiram a maior atividade proliferativa das células analisadas. O modelo de carcinogênese experimental em borda lateral de língua de hamster é uma metodologia que se presta para estudo por imunoistoquímica. E finalmente, que os anticorpos PCNA e β -catenina podem ser utilizados, nos casos leucoplasia, para analisar possíveis áreas de transformação maligna.

PALASVRAS-CHAVE: PCNA, β -catenina, imunoistoquímica, carcinogênese química, hamsters Sírio dourado.

1 INTRODUÇÃO

No início dos anos 2000, com a crescente demanda de trabalhos de pesquisa em carcinogênese experimental, buscando o entendimento dos complexos mecanismos multifatoriais envolvidos neste processo, iniciamos os primeiros trabalhos em carcinogênese em modelo animal no Laboratório de Patologia Cirúrgica, da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Ao abraçarmos esta idéia, procuramos estabelecer etapas de implantação, para que pudéssemos desenvolver e aplicarmos uma metodologia segura, eficiente e que pudesse ser reproduzida sistematicamente, em um espaço de tempo adequado, sem colocar em risco todos àqueles envolvidos, ex. técnicos de laboratório, alunos de iniciação científica, alunos de pós-graduação e pesquisadores.

Dessa forma, passamos a implantar um modelo de carcinogênese animal com aplicação de DMBA em borda lateral de língua de hamster. Nesta fase, entre a quarta e vigésima semanas de aplicação, analisamos os resultados obtidos em material processado para histoquímica pela H/E.

Posteriormente, abrimos outra frente de pesquisa, ao estudarmos a ação de fitoterápicos durante o processo de carcinogênese em pele de camundongos *hairless*, também com o uso de DMBA. Mais

recentemente, iniciamos uma nova linha de pesquisa, desta vez com aplicação de dose única de DMBA no interior de glândula submandibular de ratos. Os resultados iniciais mostram-se animadores e promissores.

Estando os modelos de implantação bem estabelecidos, passamos aos estudos enfocados mais nos mecanismos da carcinogênese propriamente dito, com utilização de marcadores imunoistoquímicos, os quais serão abordados, com mais profundidade, nos próximos capítulos.

Vale ressaltar que a utilização de marcadores imunoistoquímicos abre um amplo campo de estudos, embora nem todos os anticorpos disponíveis no mercado possam ser usados em modelo animais experimentais, principalmente pela incompatibilidade interespecíes.

O presente estudo tem por objetivo avaliar a participação do PCNA e da β -catenina nas etapas iniciais do processo de carcinogênese em modelo experimental.

Entretanto, não devemos perder de vista que a carcinogênese quimicamente induzida é uma entre inúmeras vias de sinalização na qual uma célula epitelial pode ser ativada no processo de carcinogênese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Numa pesquisa direcionada ao estudo da carcinogênese em modelos experimentais em animais, discorrer sobre toda a literatura disponível acerca dos efeitos carcinogênicos de inúmeros materiais químicos industriais e ambientais tornar-se-ia tarefa impraticável, além de realmente improdutiva.

Desta maneira, agrupar os fatos mais relevantes de cada item que apresentassem relação direta com carcinogênese, em modelos experimentais na borda lateral de língua de hamster Sírio dourado, teve como objetivo situar o leitor e fazer uma breve atualização sobre este tema.

Embora o tema em questão venha se firmando cada vez mais como linha de pesquisa desta Disciplina, não podemos perder de vista que um dos objetivos mais importantes será a síntese deste trabalho, e conseqüentemente, sua submissão para apreciação e publicação em periódico de impacto da área.

CARCINÓGENOS E CARCINOGENESE

Os agentes indutores de carcinogênese química são denominados genericamente de carcinógenos. Podemos dividir os agentes carcinógenos em: 1) agentes físicos (radiação ultravioleta e ionizante); 2) agentes biológicos (vírus) e 3) agentes químicos, que podem agir de maneira conjunta ou isolada (BOSSO & FROES, 2002).

Considera-se que, para uma substância ser um carcinógeno efetivo, ela deve interagir principalmente com constituintes celulares, incluindo as proteínas, os lipídeos, e o mais importante, com os ácidos nucleicos, que constituem o material genético das células. Um carcinógeno completo é aquele que deve possuir atividade iniciadora e promotora simultâneas, já o carcinógeno incompleto apenas a ação iniciadora (GUZMAN-SILVA & GUIMARÃES, 1985).

Existem, basicamente, três tipos de carcinógenos químicos. Componentes que tenham estruturas que permitam esse tipo de reação agem diretamente, aqueles que requerem ativação metabólica agem de maneira indireta. E finalmente, os carcinógenos não-genotóxicos e os epigenéticos parecem não se ligarem com o DNA das células,

embora possam formar adutos com outros constituintes celulares (BOSSO & FROES, 2002).

Relativamente poucos carcinógenos agem de maneira direta, uma vez que essas substâncias facilmente tornam-se instáveis. Carcinógenos de ação direta muito reativos podem não ser potente por causa de todas as reações intermediárias necessárias antes de atingir um receptor. Carcinógenos de ação direta não representam um risco considerável para a população em geral. Contudo, pessoal médico envolvido no tratamento de pacientes com agentes quimioterápicos, como a ciclofosfamida, devem estar atentos aos possíveis riscos dessas drogas (BRASILEIRO FILHO et al., 2004).

Carcinógenos de ação indireta constituem aqueles que se apresentam estáveis no ambiente e, portanto, são mais susceptíveis a entrarem em contato com a população em geral. Tais agentes, também chamados de pró - ou pré-carcinógenos requerem uma ativação metabólica antes de interagirem com macromoléculas celulares (BRASILEIRO FILHO et al., 2004).

Desta maneira, o metabolismo é governado por muitos fatores como a espécie, linhagem, sexo, idade, dieta, enzimas indutoras ou inibidoras, sistema imune, entre outros fatores. Estudos metabólicos têm identificado espécies ou linhagens que apresentam a falta de um sistema enzimático necessário para metabolizar certos pré-carcinógenos

para a forma ativa. Animais podem não apresentar um receptor celular para ativação de moléculas, como no caso de algumas linhagens de camundongos que não respondem aos hidrocarbonetos policíclico aromáticos (HPA), por não possuírem um receptor Ah (BOSSO & FROES, 2002).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) provêm principalmente da queima de plantações agrícolas, da fumaça do tabaco, da combustão do carvão, da combustão de derivados do petróleo e de motores de veículos (FRANKS & TEICH, 1990).

Estes compostos não são ativos na forma em que são ingeridos ou inalados, tornando-se reativos apenas após serem enzimaticamente convertidos, por meio de reações específicas do metabolismo (BOSSO & FROES, 2002).

Uma vez em contato com organismos, a aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH) vai medir a oxidação dos HPA e o produto será a formação de metabólitos primários epóxidos, que são inativados pela formação de conjugados, com pouca ou nenhuma reatividade com o DNA. Porém, se esse epóxido for hidratado a diidrodiol, esse composto sofre nova oxidação dando origem ao diidrodiol epóxido, forma genotóxica final altamente reativa e, portanto, com maior facilidade para reagir com os centros nucleofílicos do DNA (BOSSO & FROES, 2002).

Dentre os principais exemplos do grupo dos HPA está o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ou também conhecido como 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), que é o carcinógeno mais potente desse grupo. Apresenta como mecanismo de ação a formação de epóxidos que se ligam ao DNA e provocam a transcrição A:G ou C:T (BRASILEIRO FILHO et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que a concentração da solução de DMBA, a periodicidade nas aplicações e o tempo total de indução variam de acordo com o animal utilizado e a localização anatômica, além do tipo histológico de lesão a ser reproduzida (FARNOUSH & MACKENZIE, 1983; KLIGMAN, 2002; KITAKAWA, 2003; BOLANHO, 2004; BOLANHO et al., 2005).

O modelo de câncer bucal em hamsters exhibe muitas semelhanças com o desenvolvimento do câncer oral em humanos. Os aspectos comuns incluem a disseminação metastática do câncer primário preferencialmente para os linfonodos, alterações na expressão oncogênica (ex. p53 e/ou *ras*), a expressão de marcadores de proliferação, a expressão de γ -glutamil transpeptidase, um aumento na marcação das queratinas de baixo peso molecular, uma resposta de linfócitos citotóxicos e citocinas imunológicas (ex. fator de necrose tumoral), um aumento no crescimento tumoral como resultado da atuação de vários fatores de crescimento (ex. fator de crescimento epitelial, fator de crescimento transformante), a necessidade de uma neovascularização durante a

carcinogênese bucal, e por fim, uma resposta a quimiopreventivos (ex. retinóides, tocoferóis, carotenóides), inibindo ou prevenindo o desenvolvimento de lesões pré-malignas ou carcinomas epidermóides invasivos (KLIGMAN, 2002).

Autores têm estudado vários sistemas de testes em roedores, peixes, não-vertebrados e em embriões de aves *in ovo*. Os testes em tumor de pele de camundongos e o tumor focal de fígado em ratos tem sido utilizados para se introduzir os conceitos básicos iniciais de carcinogênese de curta e média duração.

Testes de carcinogênese em roedores de curta e média duração foram realizados em pulmão (YAMANAKA et al., 1996; ROSS et al., 1995; BUTLER, 1996; MONRO, 1996; ALBANÊS et al., 1996), em rins (SWENBERG, 1993; SHORT, 1993; CUNNINGHAM et al., 1993), em bexiga urinária (IATROPOULOS et al., 1994; WHYSNER & WILLIAMS, 1996), em pâncreas (CHU et al., 1997; HERRINGTON et al., 1997), em estômago (WHYSNER et al., 1994; SILVA et al., 1995; FURIHATA & MATUSHIMA, 1995), em cólon (QIN et al., 1994; MAGNUSON et al., 1994), em intestino delgado (YAMANE et al., 1991; OKUZUMI et al., 1992; JAGADEESAN et al., 1994) e na cavidade bucal (TANAKA et al., 1994; TANAKA et al., 1995).

O primeiro autor que obteve neoplasias intrabuciais em animais experimentais foi Bonne, em 1925, através do pincelamento de alcatrão de carvão em pele de ratos. O autor observou que os animais

pincelados desenvolveram papilomas na boca e no estômago (EVESON & MACDONALD, 1981).

A importante combinação entre tecido susceptível e carcinógeno potente foi descoberta por Salley (1954), quando investigava os efeitos dos HPA carcinogênicos na mucosa da bolsa jugal de hamsters. O autor observou que a mucosa aonde o DMBA foi aplicado três vezes por semana durante 16 semanas desenvolveu quatro estágios histológicos: hiperplasia, papiloma, carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide, com ou sem presença de metástase.

Autores como Heller et al. (1996) modificaram a técnica de Salley, através da utilização de fio de sutura de algodão embebido com DMBA, trocados semanalmente, e obtiveram 90% de sucesso na indução de carcinoma epidermóide.

Numerosos protocolos experimentais para testes de carcinogenicidade de curta e média duração tem sido descritos nos últimos anos. A maioria destes estudos procura estabelecer um modelo animal para o câncer bucal humano, e/ou elucidar os mecanismos envolvidos no efeito de carcinógenos humanos sabidamente carcinogênicos previamente identificados em estudos epidemiológicos.

Os tumores de lábio, cavidade oral e nasal podem ser produzidos através do pincelamento com 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO) no palato duro por quatro semanas (JOHANSSON et al., 1989). Carcinogênese de língua pode ser iniciada através da exposição ao

4NQO na água de beber por oito semanas (TANAKA et al., 1995). Porque esses modelos são ferramentas valiosas para a detecção dos efeitos anticarcinogênicos (TANAKA et al., 1994), resultados variados de estudos sobre a promoção até com carcinógenos por aspiração nasal (JOHANSSON et al., 1991), fazem com que esses modelos sejam menos apropriados para teste carcinogênicos.

A indução química de carcinoma epidermóide no modelo de carcinogênese em bolsa jugal de hamsters Sírio dourado é uma complementação interessante do modelo de carcinogênese em pele. A aplicação tópica repetida de carcinógeno químico dentro da bolsa jugal resulta em hiperqueratose e inflamação crônica após 4-6 semanas, hiperqueratose e atipia epitelial após 6-8 semanas, carcinoma *in situ* após 8-10 semanas, e carcinoma epidermóide invasivo após 10-16 semanas (SOLT et al., 1987).

O protocolo de dois estágios foi introduzido por Gimenez-Conti & Slaga, em 1993. Uma simples aplicação tópica de DMBA na bolsa jugal é utilizada como droga iniciadora. O tratamento de promoção começa duas semanas após a iniciação e continua por 45 semanas. Utilizado peróxido de benzoíla como controle positivo na promoção, os primeiros tumores aparecem após 20 semanas.

Para estudos sobre carcinogênese em glândulas salivares, a implantação de *pellets* de DMBA dentro da glândula submandibular (SHEEHAN & SHKLAR, 1972) ou dentro da glândula sublingual de ratos

(ROWE et al., 1970) foram utilizados para iniciar o processo de carcinogênese. As atipias ocorreram dentro de oito semanas após implantação dos *pellets* e os primeiros tumores desenvolveram dentro de 10 semanas (SHKLAR & TURBINER, 1971). Embora esta abordagem não preencheu a definição de iniciação de dose sub-carcinogênica de um agente carcinógeno, pode ser usado para demonstrar os efeitos moduladores da carcinogênese nas glândulas salivares.

Em relação aos solventes utilizados, o DMBA foi utilizado dissolvido em acetona (SALLEY, 1954); óleo mineral (SALLEY, 1955; SALLEY, 1957), parafina líquida (EVESON & MACDONALD, 1981) e dimetil-sulfóxio (DMSO) (DACHI et al., 1967).

Porém, somente em 1973, com o trabalho de Fujita et al. descobriu-se que a língua do hamster, mais precisamente a porção média da borda lateral, era o local de aplicação mais efetivo do DMBA. Anos mais tarde, Marefat & Shklar (1977) demonstraram que não era necessário provocar escarificação prévia na região para obtenção dos carcinomas, como postulado anteriormente por Fujita et al. (1973).

No Brasil, um dos primeiros grupos a estudar carcinogênese bucal foi o de Fassoni et al. (1993). Os autores utilizaram DMBA dissolvido em acetona na concentração de 0,5%, com aplicação na língua, sem escarificação prévia da região.

Posteriormente, Bolanho (2004), Bolanho et al. (2005), estabeleceram como linha de pesquisa utilizada no laboratório de

Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, a carcinogênese induzida na porção média da borda lateral da língua de hamsters, com aplicação três vezes por semana de DMBA 0,5%, diluído em acetona. Os autores enfatizaram, com relação à concentração de 0,5% DMBA em acetona, ser concentração suficiente para induzir o processo de carcinogênese, uma vez que concentrações menores não obtiveram êxito e concentrações maiores resultaram na perda de um grande número de animais.

Justificaram ainda que, a escolha da língua se prendeu ao fato de que esta área apresentou menor tempo de latência, além de exibir uma maior correlação com o que ocorre clinicamente com seres humanos. A contenção mecânica dos animais mostrou-se mais favorável que a sedação sistemática, já que esta última se mostrou inviável devido ao elevado índice de perda de animais. Além disso, ressaltaram que a bolsa jugal é uma estrutura anatômica que não é encontrada em humanos. Os autores concluíram, portanto, que a escarificação prévia não reduziu o período de aparecimento das lesões. Finalmente, atentaram para o fato de que apesar de simples, a implantação dessa metodologia requer sistematização e cuidados especiais, principalmente quanto à manipulação do DMBA, fazendo com que medidas de segurança sejam adotadas, tanto para os operadores, como para os funcionários do Biotério que tenham contato direto com os animais (BOLANHO et al., 2005).

Outros modelos experimentais têm sido utilizados, como os de carcinogênese em camundongos *hairless* e em ratos. Carmo (2004) estabeleceu metodologia para obtenção de carcinoma epidermóide em pele de camundongos *hairless*, pelo uso de 0,5% de DMBA em acetona, aplicado na região dorsal dos animais, uma vez por semana, durante 12 semanas.

Recentemente, Mainenti (2006)*, desenvolveu modelo experimental de carcinogênese, com aplicação única de 0,1 ml de solução de 2% de DMBA, em acetona, injetado diretamente nas glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvergicus*). Análises preliminares, após seguimento de 20 semanas, revelaram formação de neoplasias malignas tanto de origem epitelial, como de origem mesenquimal, além de alguns casos com a presença dos dois componentes, os chamados tumores de colisão ou carcinossarcomas.

* MAINENTI, P - Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos - Disciplina de Patologia Bucal). Comunicação pessoal, 2006.

AgNOR

A capacidade proliferativa é uma das principais características das células neoplásicas e a detecção de células proliferativas permite, através de sua contagem, obter uma estimativa das taxas de crescimento neoplásico, com conseqüente repercussão no prognóstico e no tratamento das lesões (RABENHORST et al., 1993; RABENHORST et al., 1994).

A técnica do AgNOR baseia-se na ligação da prata às proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs), evidenciando essas regiões. As NORs são alças de DNA que possuem os genes de RNA ribossômico localizados nos braços curtos dos cinco pares de cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 com importante função na formação do nucléolo. As NORs são sítios de ligação de um grupo peculiar de proteínas acídicas não histônicas (RNA polimerase I, C23 ou nucleolina e B23), que estão envolvidas na organização funcional e estrutural dos nucléolos e sempre associadas com a cromatina nucleolar (DERENZINI et al., 1990).

Ao microscópio de luz convencional, estas estruturas são visualizadas como pontos acastanhados a negros bem-definidos, que nas células em interfase estão localizadas exclusivamente dentro do nucléolo (DERENZINI et al., 1990, THERE, 2000).

Dois métodos têm sido utilizados para a análise quantitativa e qualitativa das NORs: o método de contagem e o morfométrico. O primeiro consiste na contagem de cada ponto no núcleo das células, marcados pela prata, em microscopia de luz, com uso de objetiva de 100x em imersão. No método morfométrico, a análise é feita através da mensuração automática ou semi-automática da área, perímetro, forma do contorno e grau de distribuição das NORs, coradas pela prata, através de um programa de análise de imagem (THERE, 2000).

Além da contagem do número de NORs, existem outras formas de se avaliar essas estruturas. Podem ser analisados a área, o perímetro, a forma e o grau de distribuição das NORs. Em neoplasias malignas, as NORs estão em maior número, menor tamanho e dispersas, enquanto nas neoplasias benignas, estão em menor números, maiores tamanhos e mais agrupados (ROSA et al., 1997).

Walker (1988) observou que seria interessante determinar se o comportamento das NORs poderia ser utilizado como indicador do comportamento tumoral, já que esta informação prognostica possuiria um valor superior àquelas subjetivas fornecidas pela H/E. Nesse sentido, alguns autores vêm tentando relacionar o número e a configuração das NORs com o nível de atividade celular. Este parâmetro, portanto, poderia ser utilizado como critério de malignidade, uma vez que prevê o comportamento tumoral (CROCKER, 1990; OFNER et al., 1990; DERENZINI et al, 1990; YANG et al., 1990).

Howat et al. (1989) detectaram que as células benignas tendem a possuir um nucléolo regular, com NORs fortemente agrupadas, enquanto as células malignas, freqüentemente exibem NORs dispersas pelo núcleo e múltiplos nucléolos. Alguns autores demonstraram que as NORs além de mais numerosas em neoplasias malignas, acham-se também diminuídas em tamanho (DERENZINI et al, 1990; YANG et al., 1990).

Nunes (1991) estudou 54 casos de leucoplasias bucais exibindo graus variados de atipia e observou que a contagem das NORs poderia ser útil na previsão do comportamento biológico dessas lesões. Nesse mesmo contexto, Sano et al. (1991), analisaram 39 casos de carcinoma epidermóide bucal, correlacionando gradação histológica e prognóstico, com a contagem pelo método argirofílico do AgNOR. Os autores observaram que nos carcinomas epidermóides com número médio de NORs/núcleo mais elevado, os tumores tiveram um curso clínico mais agressivo e um prognóstico mais sombrio.

Cabrini et al. (1992) realizaram estudo morfométrico das NORs, analisando sua distribuição, volume, número e formato, em diferentes camadas do epitélio normal de mucosa bucal em humanos, papiloma e carcinoma epidermóide. Para a análise foram utilizados fotomicrografias de cortes histológicos corados pelo AgNOR. Os autores acreditam que o aumento no número, maior irregularidade e diminuição no tamanho das NORs possa ser a expressão de mecanismos de



diferenciação e proliferação alterados, em associação com a síntese de novas proteínas oncogênicas presentes no carcinoma epidermóide.

Khan et al. (1993) em estudo retrospectivo de 36 lesões pré-malignas da cavidade bucal, investigaram a relação entre os dados obtidos pela análise de citometria de fluxo com as contagens das NORs. Os resultados indicaram que havia uma correlação positiva entre a citometria de fluxo e o aumento no número médio de NORs/núcleo. No entanto, segundo os autores, nem a citometria de fluxo, nem a técnica pelo AgNOR trouxeram maiores subsídios diagnósticos na gradação das atipias epiteliais das mucosas bucais analisadas.

PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína de 36kDa, acídica, não histona, que atua como auxiliar da DNA polimerase delta, estando presente principalmente no final de G1 e da fase S do ciclo celular (HUANG et al., 1994). Embora essencial para a síntese de DNA durante a fase S, o PCNA possui meia-vida longa e, conseqüentemente, está presente em níveis detectáveis em células que não estão ciclando (ALLISON & BEST, 1998).

O PCNA apresenta-se em altas concentrações durante as fases G₁ tardia e S precoce. No entanto, a expressão do PCNA não está necessariamente associada somente com a síntese de DNA na fase S, podendo ocorrer durante o reparo do DNA ou por influência de fatores de crescimento. A expressão dessa proteína pode estar desregulada em alguns tumores e nos tecidos normais adjacentes, refletindo uma possível influência de fatores de crescimento autócrino ou parácrino na expressão do PCNA (MCCORMICK & HALL, 1992).

Estudando marcadores de atipia no trato aerodigestivo, Coltrera et al. (1992) observaram existir uma forte correlação entre atipia e expressão suprabasal do PCNA. Os autores sugerem que a proliferação ocorrendo acima da camada basal poderia sinalizar uma alteração significativa no controle de proliferação celular, mas estabeleceram a necessidade de outros estudos que venham a validar a expressão suprabasal do PCNA como um marcador de pré-malignidade.

Shin et al. (1993) analisaram a expressão do PCNA nas camadas basal, parabasal e superficial dos epitélios adjacentes aos carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço. A avaliação da distribuição espacial do PCNA pode ser útil na identificação de diferenças na regulação da proliferação em cortes de aspecto histológico semelhante e na avaliação do risco de desenvolvimento tumoral. Os autores constataram uma expressão de PCNA quatro vezes maior na camada basal e seis vezes maior na parabasal. A expressão do PCNA aumentou

com a progressão dos tecidos de epitélio normal para hiperplasia, de hiperplasia para atipia e desta para carcinoma, sendo maior na camada parabasal em relação à basal em todos os estágios potencialmente malignos. Os autores concluíram que existem pelo menos dois eventos genéticos separados regulando o padrão de proliferação tecidual: um atuando na camada basal e outro nas células que estão deixando a camada basal.

Huang et al. (1994) avaliaram a expressão do PCNA em lesões bucais, buscando determinar se a expressão suprabasal deste antígeno está correlacionada com a pré-malignidade. Os autores encontraram uma significativa predileção por um padrão de marcação basal/suprabasal em lesões com progressão para malignidade, quando comparado com um padrão estritamente basal visto em condições normais e lesões benignas. Um padrão não esperado, caracterizado por uma marcação somente suprabasal foi notado principalmente em hiperplasias reativas. Como não houve um acompanhamento clínico dos casos, não se pode estabelecer se a reatividade do PCNA sofreu alteração com o tempo, sendo difícil atribuir um papel preditivo para este marcador. Os autores sugerem que com a progressão para a malignidade há um aumento na reação basal/suprabasal.

Com o objetivo de analisar alguns parâmetros da atividade do ciclo celular em lesões bucais potencialmente malignas, Donofrio et al. (1995) utilizaram uma análise combinada das NORs e PCNA. Os autores

sugerem que os altos valores de NORs e PCNA encontrados em algumas atipias moderadas e intensas poderiam representar um “sinal de alarme” acerca da hiperatividade proliferativa, e talvez ser uma indicação para uma intervenção clínica cuidadosa, ou até um tratamento mais radical destas lesões potencialmente malignas.

Nesta mesma linha de pesquisa, Kobayashi et al. (1995) analisaram a atividade proliferativa de displasias epiteliais orais, através da marcação pelo PCNA, AgNOR e o índice de figuras de mitose. Nesse estudo os autores encontraram uma maior marcação das células basais e parabasais pelo PCNA, nos casos de leucoplasias e em todas as camadas epiteliais nos carcinomas epidermóides.

A expressão imunoistoquímica do PCNA e p53 foi investigada em displasias epiteliais e carcinomas de células escamosas da cavidade oral por Lan et al. (1996), que concluíram que a combinação de intensa reatividade para esses dois marcadores foi indicativo de pouca diferenciação, atipia nuclear intensa e comportamento mais invasivo das células tumorais.

Birchall et al. (1997) analisaram apoptose, mitose, expressão do PCNA e bcl-2 em epitélio bucal normal, hiperplásico, lesões de atipia e carcinomas. Os autores observaram um aumento do índice mitótico em atipias e carcinoma epidermóide, mas encontraram que a expressão do PCNA está dissociada do número de mitoses, sugerindo a

participação desta proteína em um processo alternativo ligado ao reparo do DNA.

De Rosa et al. (1999) estudaram 44 lesões com potencial de malignidade e lesões malignas do lábio, sendo 30 carcinomas epidermóides, 7 queilites actínicas, 3 leucoplasias e 4 metástases nodais de carcinoma epidermóide de lábio inferior, através da marcação pelo AgNOR, PCNA, p53 e c-myc. Os resultados indicaram que o tamanho e número das NORs e a porcentagem de células PCNA-positivas são parâmetros sensíveis para a discriminação entre lesões potencialmente malignas e carcinomas epidermóides, e para o prognóstico do subtipo de carcinoma epidermóide de lábio inferior. Lesões p-53 positivas podem ser consideradas de alto risco para progressão para a malignidade, enquanto que as lesões c-myc-positivas parecem estar correlacionadas com as fases tardias da carcinogênese de lábio.

β-Catenina

O complexo de cateninas consiste na α-catenina (102kDa), β-catenina (92kDa) e a γ-catenina/placoglobina (83kDa). O gene da α-catenina localiza-se no cromossomo 5q31, o da β-catenina no 3p21 e o da γ-catenina/placoglobina no cromossomo 17q21. Uma quarta

molécula "*catenina-like*", p120^{ctn} também conhecida como p120^{cas} foi recentemente descrita e localiza-se no cromossomo 11q11, imediatamente adjacente ao centrômero (BEAVON, 2000).

O gene da β -catenina está localizado em uma região do genoma humano que se encontra freqüentemente alterada em uma série de neoplasias malignas. Juntamente com a γ -catenina (placoglobulina) e a α -catenina, a β -catenina foi primeiramente isolada como uma proteína associada com a porção citoplasmática da E-caderina. Sabe-se que a β -catenina liga a E-caderina à α -catenina e, por conseguinte, a estrutura dos microfilamentos de actina ao citoesqueleto. Desta maneira, pode-se inferir que a β -catenina possui um papel muito representativo no que diz respeito à adesão celular (BEAVON, 2000; CASTILHO, 2003).

A β -Catenina foi inicialmente descrita em humanos como um membro dos cintos de adesão, sendo associada ao domínio citoplasmático da Caderina-E, uma proteína transmembrânica envolvida na adesão celular dependente de Ca^{2+} . Além da função sinalizadora na via do Wnt e adesão celular, a β -Catenina possui funções variadas, interagindo com proteínas como a actina, facina e presenilinas (TAO et al., 1996; NISHIMURA et al., 1999; LEVESQUE et al., 1999).

A proteína β -Catenina consiste de uma região N-terminal, com aproximadamente 130 aminoácidos, uma região central de 550 aminoácidos e uma região C-terminal com 100 aminoácidos. Seu N-terminal contém um sítio de fosforilação para o GSK-3 β , enquanto que o

C-terminal possui a função de transativação requerida para a ativação de genes alvo. Seu domínio central contém 12 repetições de seqüências imperfeitas formadas por 42 aminoácidos conhecidos como repetições "*armadillo*", os quais são requeridos para a interação com várias proteínas como as caderinas, APC e os fatores de transcrição TCF/LEF (CADIGAN & NUSSE, 1997; MILLER & MOON, 1996; HUBER et al., 1997).

A β -Catenina exibe duas funções distintas, a primeira na junção celular ligando-se tanto ao domínio citoplasmático da Caderina-E, quanto a porção amino-terminal da α -Catenina, sendo essencial para a promoção da adesão intercelular, através da conexão da Caderina-E com o citoesqueleto de actina. Sua segunda função, quando na forma monomérica ou livre, esta relacionada com a via de sinalização que envolve o complexo de transativação com os fatores de transcrição LEF/TCF. Quando migra para o núcleo, atua na atividade transcripcional e na indução da divisão ou diferenciação celular (BEHRENS et al., 1996; MOLENAAR et al., 1996), associado à ativação de genes-alvo como Myc (HE et al., 1998), Ciclina D1 (TETSU, 1999; SHUTTMAN, 1999), C-jun (MANN, 1999); Fra-1 (MANN, 1999); MMP-7 (CRAWFORD et al., 1999); CD44 (WIELENGA et al., 1999); Fibronectina (GRADL et al., 1999), COX-2 (HOWE et al., 1999; HAERTEL et al., 2000).

As mutações da β -Catenina parecem ser um passo crucial na transformação maligna, sugerindo um papel fundamental no controle da proliferação celular ou mesmo apoptose, mas não só a mutação da β -

Catenina é responsável por todo este processo (CASTILHO, 2003; PINTO JR, 2003).

A degradação da β -catenina parece ser realizada primeiramente através da glicogênio sintase kinase-3 β (GSK-3 β), no sítio composto por três serinas, uma treonina, cada uma separada por três resíduos e , posteriormente, pela cascata de ubiquitinização/proteossomo (CASTILHO, 2003).

Tetsu & McCormick (1999) verificaram que a β -catenina ativa a transcrição do promotor da ciclina D1. As células que expressam β -catenina mutante produzem altos níveis de ciclina D1, tanto na expressão do mRNA, como da própria proteína. Os autores acreditam que níveis anormais de β -catenina podem contribuir para a transformação neoplásica devido ao acúmulo de ciclina D1.

A via de sinalização do WNT orchestra um grande número de programas de desenvolvimento. Os membros da família de genes Wnt têm importantes funções no crescimento e diferenciação celular, onde atuam através de uma via de sinalização mediada por receptor (EATON & COHEN, 1996).

Uma das ações da via de sinalização do Wnt é provocar a estabilização da β -catenina. A β -catenina é uma proteína de múltiplas funções que é, tanto um componente importante das junções celulares, como membro de destaque de uma via de sinalização. A β -catenina citoplasmática é altamente regulada. Na ausência de um sinal mitogênico

de fora da célula, a β -catenina forma complexos com o produto do gene APC, uma quinase sintase de glicogênio (GSK3 β) e um membro recém descoberto a proteína Axina, que levam à degradação da β -catenina livre (IKEDA et al., 1998).

Quando um sinal mitótico é enviado pela via de sinalização do Wnt, a GSK3 β é antagonizada, de forma que a β -catenina não é mais degradada, a concentração no citosol aumenta e ocorrem ligações com outras proteínas, principalmente fatores de transcrição que são transportados para o núcleo, como o LEF-1 (*lymphocyte enhancing factor*) e o fator de células T. Assim sendo, esta via de sinalização tem a capacidade de promover a proliferação celular, bem como favorecer o aparecimento de metástases (BULLIONS & LEVINE, 1998; JANKOWSKI et al., 1997).

Níveis aumentados da β -catenina podem levar a uma conversão neoplásica ativando o gene da ciclina D1 e conseqüentemente uma progressão descontrolada do ciclo celular (GOMES, 2001; PINTO JR, 2003).

Pinto Jr (2003), em seu estudo acerca da expressão e participação da β -catenina em carcinoma epidermóide bucais, através do estudo imunoistoquímico de 39 casos embrocados em parafina e de imunofluorescência, em várias linhagens de carcinoma epidermóide em cultura de células, faz uma análise acerca das diferentes localizações da



β -catenina correlacionando seus achados de pesquisa com a literatura pertinente.

Observou que a hiporegulação das moléculas de adesão é fator marcante e decisivo para a proliferação, invasão e até mesmo no início do processo de carcinogênese. Com relação a expressão da β -catenina no citoplasma das células neoplásicas, o autor acredita que este fato evidencia que alguma desregulação do complexo de degradação da β -catenina deva estar ocorrendo nessa neoplasia. Mutações ou alterações na função de outros genes, como o GSK3 β , Axina e APC levam ao acúmulo da β -catenina no citoplasma, tornando assim a célula predisposta à divisão. Já com relação ao acúmulo nuclear da β -catenina, acredita que este fato juntamente com a expressão citoplasmática foi o seu resultado mais importante em sua pesquisa (PINTO JR, 2003).

Enfatiza ainda que, quando o complexo tetramérico de degradação da β -catenina está corrompido, seu acúmulo citoplasmático é favorecido, possibilitando sua ligação com o fator de transcrição LEF/TCF, que por sua vez atua no núcleo celular, ativando genes alvos como a ciclina D1, com conseqüente aumento de seus níveis. A ativação desses genes levaria a célula a uma atividade proliferativa maior, fazendo com que a neoplasia se comporte de uma forma mais agressiva (PINTO JR, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão da proteína nuclear de proliferação celular (PCNA) e da β -catenina, comparativamente com a marcação histoquímica pelo AgNOR, na etapa inicial do processo de carcinogênese quimicamente induzido pelo DMBA, em borda lateral de língua de hamsters Sírio dourado (*Mesocricetus auratus*).

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 hamsters Sírios dourados, machos e fêmeos, com peso aproximado de 150 gramas, com dois a seis meses de idade. Os animais foram mantidos sob condições ambientais constantes (temperatura), ventilação contínua e forçada, e foram alimentados com ração comercial e água à vontade.

Após uma semana de adaptação ao novo meio ambiente (Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP), todos os animais foram pesados, no início e ao término do experimento, para acompanhamento da variação da massa corpórea.

Todos os procedimentos foram cuidadosamente executados e previamente autorizados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, protocolo nº024/2000-PA/CEP, de 11 de dezembro de 2000 (Anexo 2).

Foram acondicionados cinco animais por gaiola e a seguir, todos os animais foram identificados com tinta nanquin preta e seringa de insulina. A agulha foi introduzida no subcutâneo da região subpalmar e/ou subplantar, com inclinação da agulha não superior a 15 graus e a seguir injetado aproximadamente 0,05ml de tinta na região (BOLANHO, 2004; BOLANHO et al., 2005).

Os 20 animais do grupo de estudo foram submetidos a três aplicações semanais de uma solução de 0,5% de DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno /Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA), diluído em acetona, utilizando pincel de pêlo de marta nº 0. Durante a aplicação, os animais foram contidos mecanicamente, de modo que mantivessem a boca aberta. Ensaios anteriores demonstraram que a aplicação de solução de sedativo e miorelaxante muscular, três vezes por semana, levaram a perda de mais de 80% dos animais por excesso de medicação intramuscular.

A seguir, com auxílio de uma pinça dente-de-rato, a língua foi tracionada, permitindo que a solução de DMBA fosse aplicada somente na borda lateral esquerda da língua dos animais (BOLANHO, 2004; BOLANHO et al., 2005).

Os vinte animais do grupo controle receberam o mesmo tratamento do grupo de estudo, com retirada do DMBA, nestes animais foram aplicados somente acetona três vezes por semana, com pincel de pêlo de marta nº 0, na borda lateral esquerda da língua dos animais.

Ao final da oitava semana de aplicação, todos os animais (20 grupo de estudo+ 20 grupo controle) foram sacrificados, após a administração de uma overdose do anestésico veterinário Rompun® associado ao relaxante muscular Dopalen®. Após os sacrifícios, as línguas foram removidas e fixadas em formaldeído a 10%.

Uma vez que o DMBA é uma substância comprovadamente carcinogênica e mutagênica, material de proteção individual para os operadores, como óculos e máscara acrílica de proteção, avental cirúrgico, gorro e dois pares de luva para cada operador, foram utilizados durante todo o experimento. Material de proteção adicional para os técnicos diretamente envolvidos na manutenção e limpeza das gaiolas também foi fornecidos.

A preparação da solução de DMBA em acetona foi realizada em câmara fechada com sistema de exaustão, e a seguir foram aliquotadas em frascos de vidro e estocadas em geladeira a 4°C até o momento da utilização.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica por imunistoquímica para os anticorpos anti β -Catenina e anti PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) foram realizados no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP.

Inicialmente, cortes de 3 μ m de espessura, montados sobre lâminas previamente preparadas com solução de ATPS (3-*aminopropyltrithoxsilene*, SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 5% em etanol absoluto, foram desparafinizadas em xilol e hidratadas por passagens sucessivas em etanol de concentrações descendentes (do etanol absoluto ao etanol 80%). A remoção de pigmento formólico foi realizada em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 95%, por 10 minutos.

Previamente à incubação com anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para recuperação antigênica, realizado com ácido cítrico pH 6.0, em banho Maria a 95°C, por 15 minutos. Após o tratamento, foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena, através da solução de peróxido de hidrogênio a 6% e água (1:1, V/V), em duas passagens de 15 minutos cada.

As lavagens entre as etapas foram realizadas com solução tamponada de Tris-HCl (Tris-Hydroximetil-Aminometano/Ácido clorídrico, SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0,05M, em pH 7.4.

A diluição do anticorpo primário foi previamente otimizada no laboratório, obtendo-se como concentração final adequada do anticorpo anti β -Catenina (Transduction, USA) em 1:100 e a do anticorpo anti-PCNA (clone PC10) em 1:75. O anticorpo secundário utilizado foi o polivalente, anticabra, anticoelho e anticomundongo, e o soro terciário foi a streptoavidina-biotina com peroxidase conjugada. Estas soluções são

pré-fabricadas e requerem incubação em temperatura ambiente por 30 minutos (Kit LSAB+, DAKO Co, Carpinteria, CA, USA, N° K0690).

A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyl-tetrahydrochloride, SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7.4 e adicionado peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Meyer, a desidratação em cadeias de concentrações ascendentes de etanol (do etanol 50% ao etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para controle positivo da reação foi utilizado carcinoma epidermóide com padrão de revelação já conhecidos para o marcador PCNA. O controle positivo da β -Catenina foi identificado em cada caso, através da análise do epitélio da região direita da borda lateral da língua dos animais do grupo controle.

O controle negativo foi realizado pela não utilização do anticorpo primário. Nas reações imunoistoquímicas foi utilizado um sistema automático universal de coloração (Dako Auto Staining®, DAKO C, Carpinteria, CA, USA). Nesse sistema, as etapas de incubação do anticorpo primário até a etapa de contra-coloração com hematoxilina de Meyer foram feitas de forma automática.



ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Após a inclusão das peças em parafina, obtivemos cortes de 5 µm de espessura, sendo que parte do material foi submetido à marcação pela hematoxilina e eosina, e parte pela técnica de AgNOR. A técnica pelo AgNOR foi realizada segundo Ploton et al. (1986), conforme descrição detalhada relacionada no Anexo 3.

A análise quantitativa das NORs foi realizada por dois examinadores independentes, através de microscópio de luz convencional (Axiophot-Axioplan 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), com ocular de 10x e objetiva de 63x em imersão, perfazendo um aumento final de 630x.

As NORs com contornos nucleares imprecisos ou sobrepostas não foram consideradas. NORs que exibiam uma proximidade muito acentuada, dificultando sua individualização, foram consideradas como uma estrutura única. Os núcleos que não apresentavam NORs não foram analisados, pois a falta dessa estrutura poderia estar relacionada ao plano de corte do material, estando localizadas em um plano acima ou abaixo daquele analisado. Foram ignorados os núcleos e as NORs que estavam localizadas nas bordas laterais das imagens. A contagem visual das NORs foi realizada nas imagens digitalizadas, sendo selecionados áreas representativas, até se

obter a contagem de 100 núcleos por animal. A seguir, foram obtidos os números médios de NORs/núcleo de todas as amostras dos dois grupos analisados.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

As colorações histoquímicas pela H/E e pelo AgNOR, bem como a imuno-marcação pela β -Catenina e pelo PCNA, foram analisadas qualitativamente através de microscopia de luz convencional.

A β -Catenina foi analisada em seus aspectos qualitativos, observando-se as localizações definidas como: membranas celulares, citoplasmáticas e/ou nuclear, e as regiões de marcação em basal, parabasal e/ou camada espinhosa media e alta.

Para obtenção dos índices do PCNA, apresentados pelas células epiteliais dos grupos de estudo e do grupo controle, foram selecionadas áreas representativas. Para determinação desses índices, foram contadas trezentas células, através de microscopia de luz, com objetiva de imersão e aumento final de 630x.

Os números de pontos de NORs distintos em cada núcleo foram contados em cem células, através de microscopia de luz, com objetiva de imersão e aumento final de 630x.

Durante as contagens, foi utilizado um retículo graduado, medindo 0,8 x 0,8mm, dividido em 16 quadrados de 0,2 x 0,2mm, para delimitação dos campos microscópicos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a média aritmética e calculado o desvio-padrão das porcentagens das células PCNA-positivas e dos números de NORs/núcleo dos grupos analisados. A seguir, as médias aritméticas dos índices de PCNA e das NORs foram submetidas, separadamente, ao teste estatístico ANOVA, para se verificar se os dados apresentavam semelhanças ou diferenças entre si.

Nos casos em que houve diferença estatística entre as médias aritméticas, as mesmas foram submetidas ao teste estatístico de Tukey, para se determinar quais foram os grupos que apresentaram dados diferentes. O nível de significância fixado foi de 5%.

Os teste estatísticos foram realizados utilizando-se os softwares MINITAB® *for Windows* (versão MINITAB® Release 14.12.0, 2004, Minitab Inc.) e *STATISTICA*® (Kernel Release 5.5, 2004, StatSoft Inc, Tulsa, USA) e o programa Microsoft® Excel 2002 (Microsoft, USA).

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

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

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

5 RESULTADOS

Os animais do grupo de estudo (n=20), de uma maneira geral, apresentaram clinicamente pequenas áreas região leucoplásica nas regiões de aplicação do DMBA, entre a sexta e oitava semana após o início do experimento (n=13). Cinco animais exibiram crescimento exofítico nas áreas de aplicação, que variavam desde pequenas lesões papilomatosas (n=3), formação de lesões clinicamente compatíveis com papilomas (n=2) e epitélios com características de atipia (n=2).

Os casos do grupo controle não exibiram alterações clínicas significativas. Não foram encontradas alterações de coloração, nem de textura das áreas de aplicação da acetona.

Ao exame histopatológico foi observado que 13 casos mostraram somente a presença de hiperparaqueratose (Figura 3-A). Entre os outros sete casos do mesmo grupo, cinco exibiram proliferação papilomatosa inicial até a formação de papilomas (Figuras 2A, 2B e 2C) e dois apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com atipia epitelial (Figura 3-C).

Os cortes histopatológicos das amostras do grupo controle exibiram casos com hiperqueratose focal, discreta acantose e presença de atrofia também de maneira focal. Ausente a discreto infiltrado

inflamatório mononuclear foi observado em situação perivascular. As lâminas próprias da mucosa de língua de hamster exibem de maneira padrão uma estreita faixa de tecido conjuntivo e logo abaixo, grande quantidade de fibras musculares esqueléticas, compondo a maior estrutura da região sub-mucosa.

Com relação à marcação argirofílica das NORs, nos casos do grupo de estudo formado por quadro histopatológicos diagnosticados como hiperplasia tecidual [projeções papilomatosas (n=3); papilomas (n=2) e atipias epiteliais (n=2)], apresentaram os maiores valores médios de NORs/núcleo ($2,2471 \pm 0,2494$) (Figura 1-C). Neste grupo as NORs estavam não somente em um maior número, mas exibiam um formato mais irregular e eram menores em tamanho.

Os outros casos do grupo de estudo (n=13) foram diagnosticados como exibindo como alteração mais representativa hiperparaqueratose. Neste grupo, a média de NORs/núcleo foi de $1,9707 \pm 0,1843$, mostrando estruturas mais regulares e de formato mais arredondado (Figura 1-B).

O grupo controle apresentou média de NORs/núcleo de $1,616 \pm 0,1368$, exibindo um padrão de formato bem arredondado mais constante e pouca variação de tamanho (Figura 1-A).

A análise estatística deste grupo mostrou existir diferença estatisticamente significativa entre os casos de hiperplasia, hiperparaqueratose e os casos controle ($p < 0,05$), quando as médias de

NORs/núcleos foram comparadas (Figura 6). Uma análise de correlação entre as médias de NORs/núcleos entre os casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e controle, mostrando existir uma correlação positiva (Figura 7).

Com relação à análise dos anticorpos utilizados, ao PCNA revelou imuno-marcação de maneira constante nas células germinativas da camada basal, em qualquer situação do epitélio de revestimento, tanto nos casos controle, como nos casos de hiperplasia e hiperqueratose do grupo de estudo (Figuras 2-A, 2-B, 2-C, 2-D e Figuras 3-A, 3-B, 3-C).

Nos casos de hiperparaqueratose (n=13) a média de PCNA-positivo foi de $25,8461 \pm 12,6941\%$, exibindo marcação nas células da camada basal e para-basal de maneira eqüitativa.

Foi observado que, conforme o quadro histopatológico caminhava no sentido da formação de hiperplasias papilomatosas, papilomas até os quadros mais representativos de atipia epitelial (Figuras 3-A, 3-B, 3-C), a imuno-marcação foi exibindo valores maiores de PCNA-positivo ($54,1428 \pm 10,0054\%$) na camada parabasal, chegando por vezes à camada espinhosa, em seu terço médio e alto, e raramente em células da camada granulosa (Figuras 2-A, 2-B, 2-C, 2-D).

No grupo controle foi observado marcação do PCNA somente das células da camada basal, representando um percentual de $15 \pm 2,4920\%$ de PCNA-positivos, valor que se manteve constante, com poucas variações entre os casos analisados.

A análise estatística mostrou existir diferença estatisticamente significativa entre os casos de hiperplasia, de hiperparaqueratose e os casos controle ($p < 0,05$), referente à porcentagem média de PCNA-positivos (Figura 8). Uma análise de correlação entre as médias de PCNA entre os casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e controle, mostrou existir uma correlação positiva (Figura 9). Os dados relativos ao teste ANOVA encontram-se relacionados no ANEXO 1.

A análise qualitativa da β -catenina mostrou imuno-marcação nos casos controle ($n=20$) de maneira uniforme na membrana citoplasmática das células epiteliais de praticamente em toda extensão do epitélio de revestimento, com maior adensamento nas regiões basais e parabasais (Figura 4-A).

Nos casos de hiperparaqueratose, observamos um padrão de imuno-marcação da β -catenina da membrana citoplasmática restringindo-se principalmente as células epiteliais das camadas basais e parabasais, de maneira descontínua, e de forma menos exuberante do que àquelas observado no grupo controle (Figuras 4-B, 5-A).

Nos casos de hiperplasia, a imuno-marcação da β -catenina foi modificando seu padrão, apresentando uma diminuição acentuada na membrana citoplasmática das células da camada basal e parabasal, e início de deposição da proteína no interior do citoplasma dessas células (Figura 4-C). Observamos ainda que nos casos de atipia

houve uma presença de imuno-marcação no núcleo das células, uma não marcação na membrana citoplasmática e eventuais células epiteliais basais e parabasais, com discreta marcação intra-citoplasmática (Figuras 5-B, 5-C).

FIGURA 1

LEGENDAS

FIGURA 1 - Marcação das NORs das células epiteliais da mucosa de revestimento da língua de hamster Sírio dourado, pela técnica histoquímica argirofílica pela prata (AgNOR).

- A - Marcação das NORs (cabeça de setas) do núcleo de células do epitélio normal (Grupo Controle). Observar a configuração arredondada e o padrão bem definido das NORs. 630x**
- B - Fotomicrografia de epitélio de revestimento de mucosa de grupo de estudo em sua espessura total, mostrando vários núcleos com marcação argirofílica das NORs (setas). Notar variação da NORs regulares (setas) e irregulares (cabeça de seta). Destaque para presença de camada de hiperparaqueratose (h) e camada granulosa (g). 200x**
- C - Área focal do epitélio do grupo de estudo exibindo núcleos com NORs de tamanhos variados e irregulares (setas). 630x**

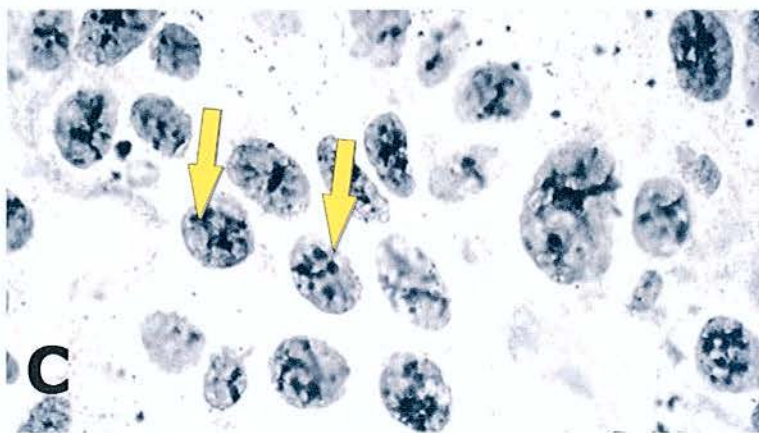
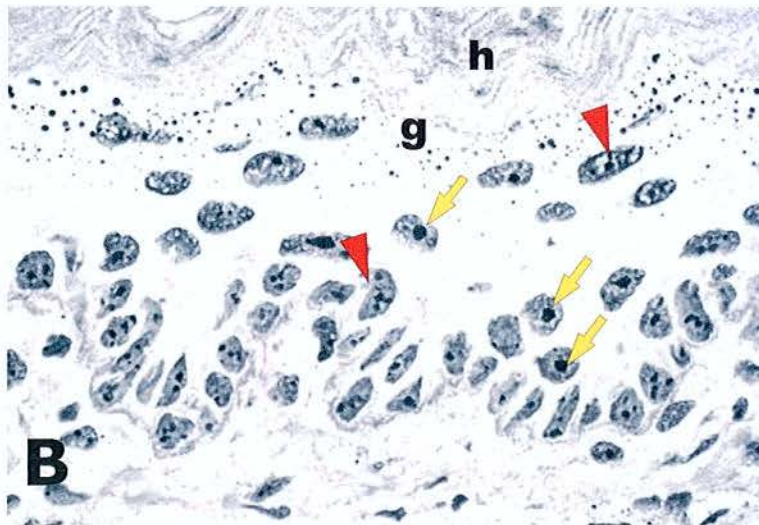
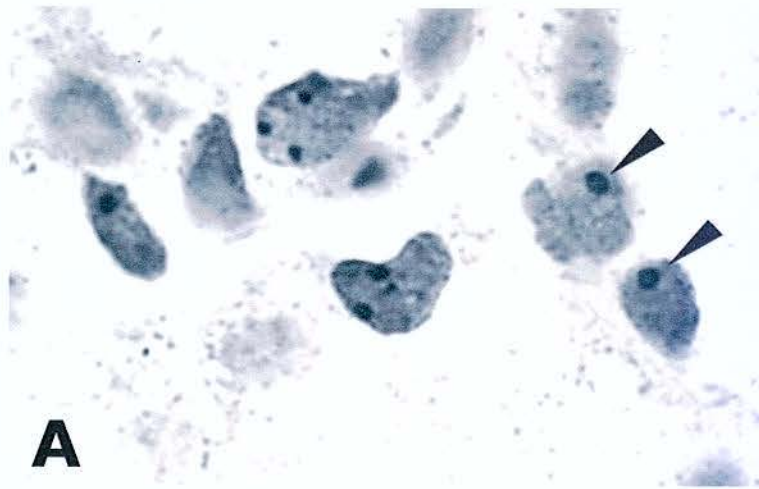


FIGURA 2

LEGENDAS

FIGURA 2 - Imuno-marcação do núcleo das células epiteliais da mucosa de revestimento da língua de hamster Sírio dourado, pelo anticorpo PCNA, através de técnica imunoistoquímica.

- A - Imuno-marcação mais concentrada dos núcleos das células da camada basal e parabasal (setas) do epitélio de revestimento do grupo de estudo. Observar a imuno-marcação, em área focal, dos núcleos de células da camada espinhosa (cabeça de seta) e da camada granulosa (*). Presença de hiperparaqueratose (barra). PCNA 200x**
- B - Detalhe da imuno-marcação pelo PCNA dos núcleos das células da camada basal e parabasal. Observar um padrão mais regular e mais homogêneos dos núcleos marcados. PCNA 630x**
- C - Área focal com intensa imuno-marcação pelo PCNA de região de cones epiteliais, exibindo intensa proliferação celular. PCNA 630x. Detalhe de pleomorfismo nuclear acentuado. PCNA 1200x (zoom digital)**

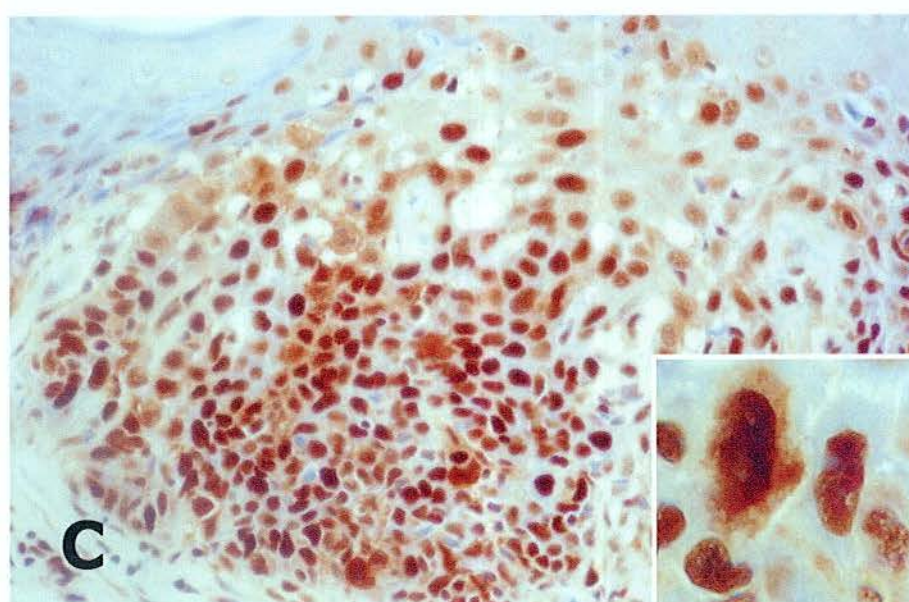
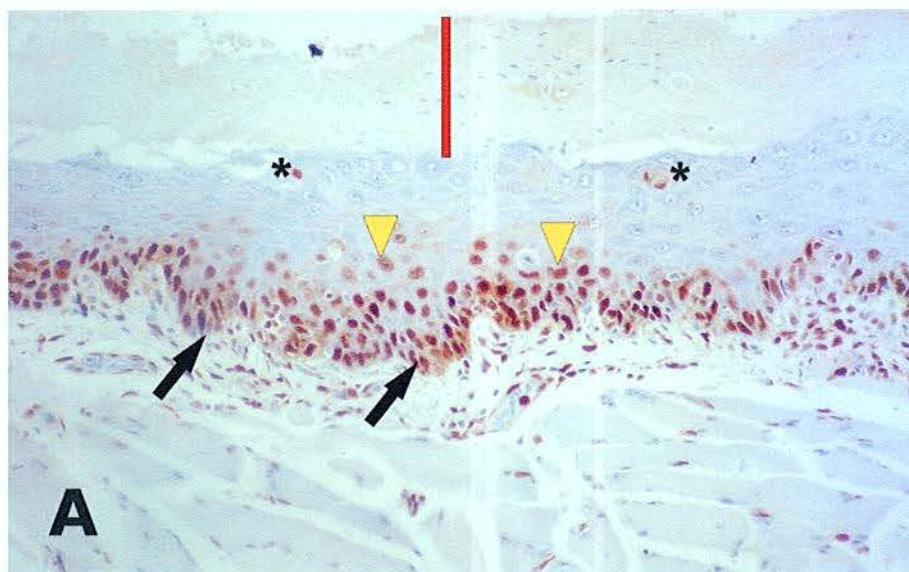


FIGURA 3

LEGENDAS

FIGURA 3 - Imuno-marcação do núcleo das células epiteliais da mucosa de revestimento da língua de hamster Sírio dourado, pelo anticorpo PCNA, através de técnica imunoistoquímica.

- A - Imuno-marcação em região apresentando início de formação de projeção papilomatosa do epitélio de revestimento. Observar a imuno-marcação em toda extensão da camada basal (setas). Em áreas focais presença de imuno-marcação em núcleos de células da camada parabasal (cabeça de setas). PCNA 200x**
- B - Vista geral da imuno-marcação positiva dos núcleos celulares pelo PCNA, em área de formação de papiloma. Maior quantidade de núcleos positivos na região parabasal. Núcleos positivos também são observados na camada basal e camada espinhosa. PCNA 100x**
- C - Detalhe da figura anterior. PCNA 630x.**

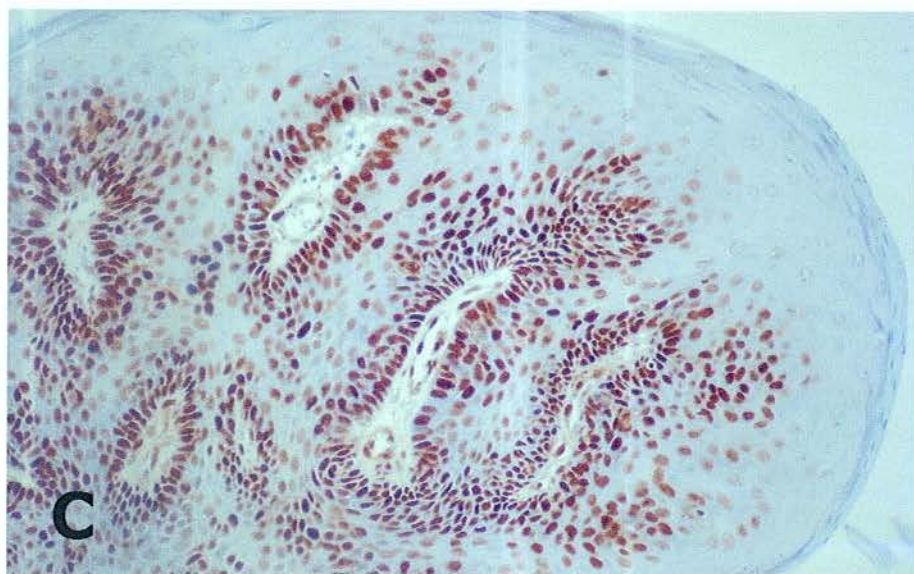
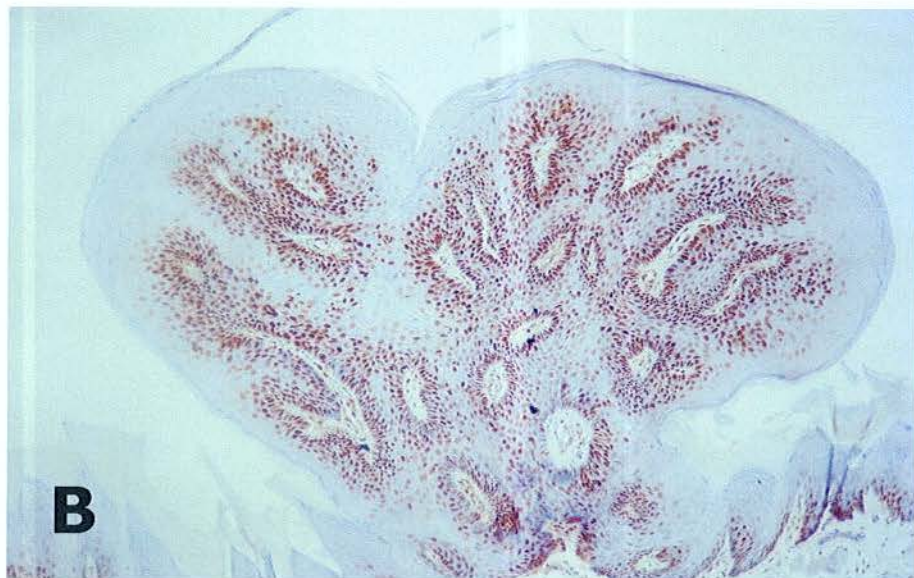
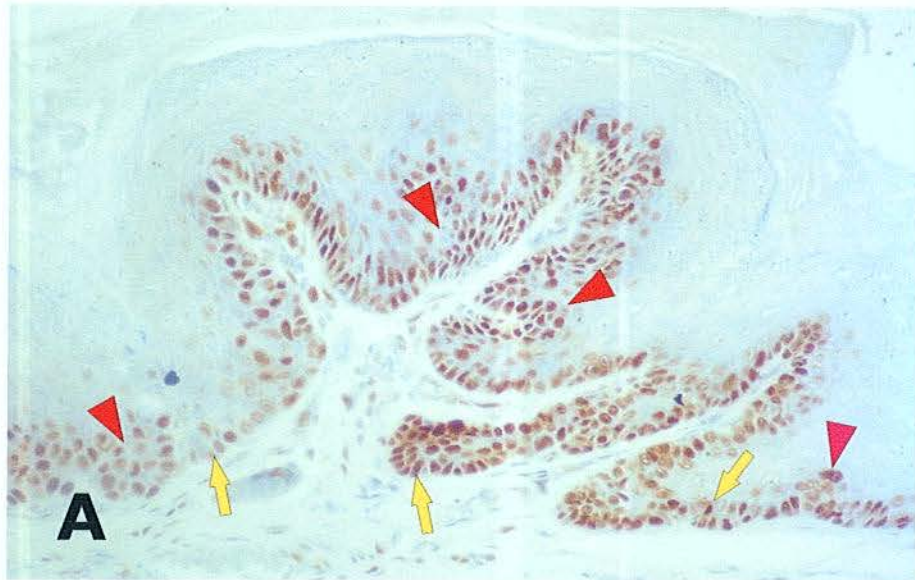


FIGURA 4

LEGENDAS

FIGURA 4 - Imuno-marcação do epitélio de revestimento da mucosa da língua de hamster Sírio dourado, pelo anticorpo β -catenina, através de técnica imunoistoquímica.

- A - Imuno-marcação positiva pela β -catenina (setas) na parede da membrana plasmática das células epiteliais, em toda extensão do epitélio, com maior intensidade nas regiões parabasal e basal. β -catenina 630x**
- B - Diminuição da imuno-marcação pela β -catenina nas regiões de parede de membrana plasmática das células epiteliais da camada parabasal (setas). β -catenina 1000x**
- C - Acúmulo intra-citoplasmático do anticorpo e início de marcação em região nuclear (setas). β -catenina 2000x (zoom digital).**

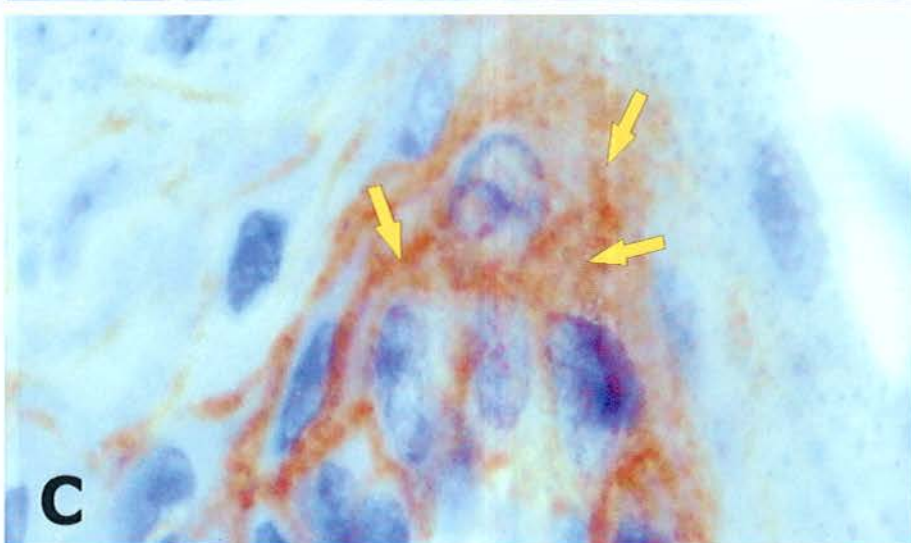
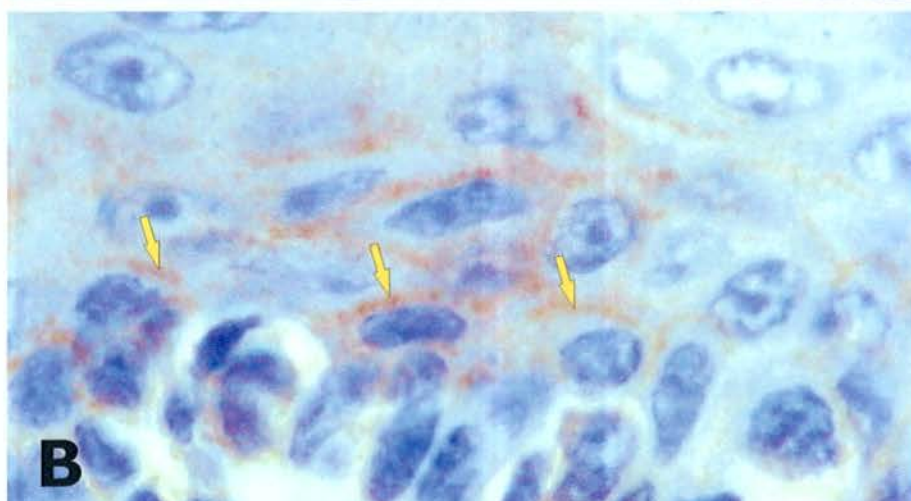
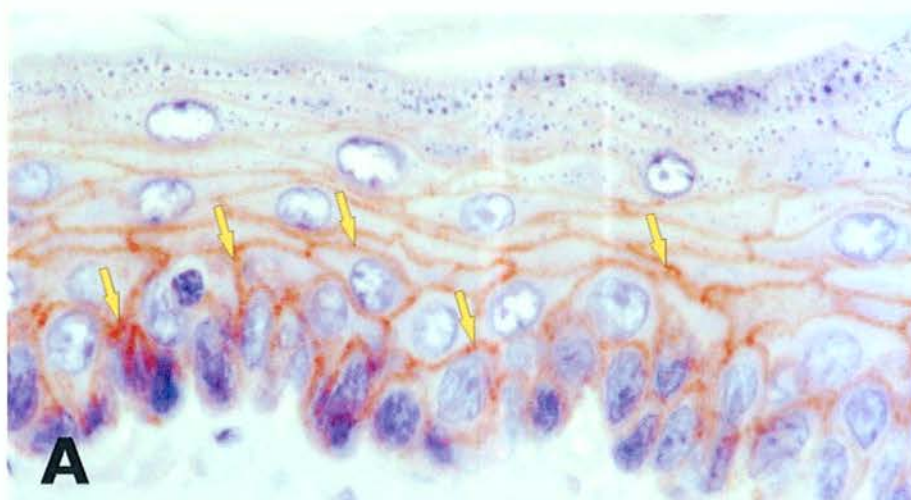
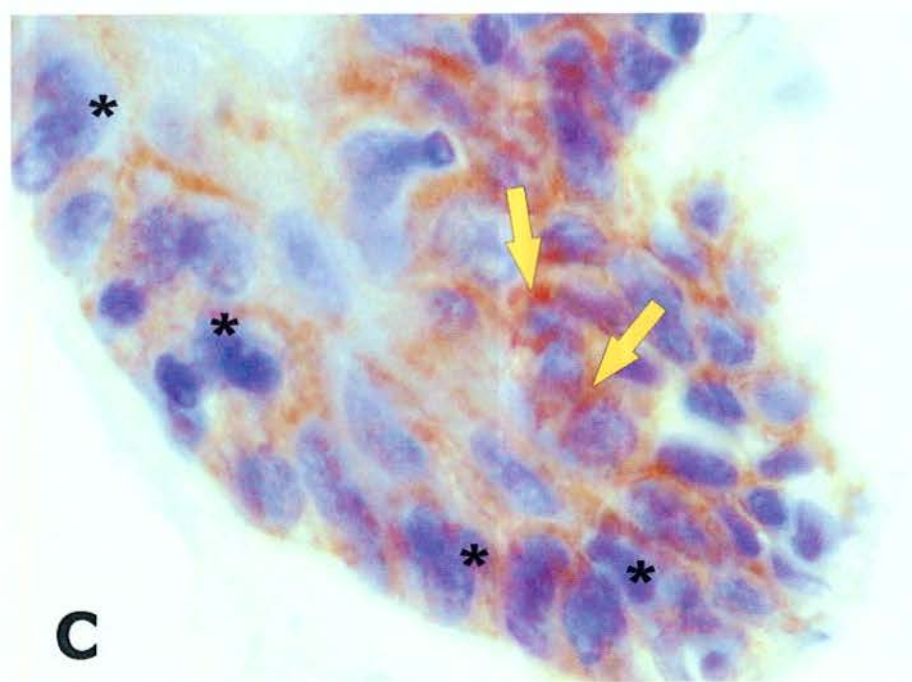
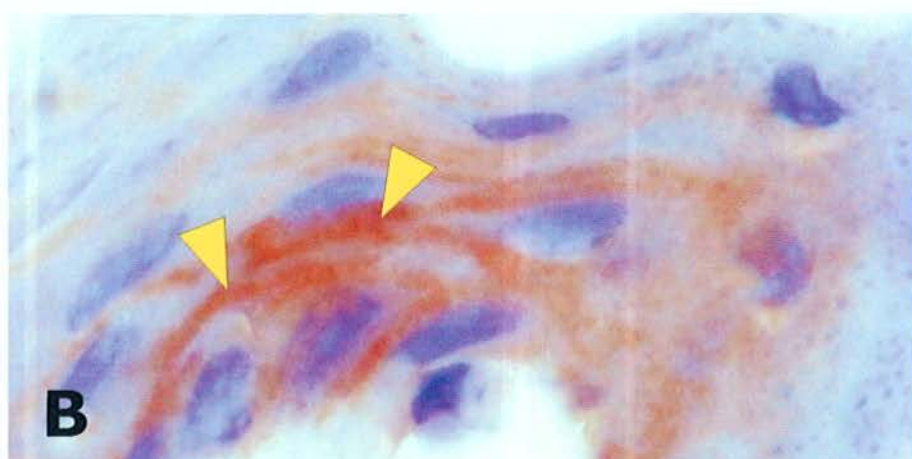
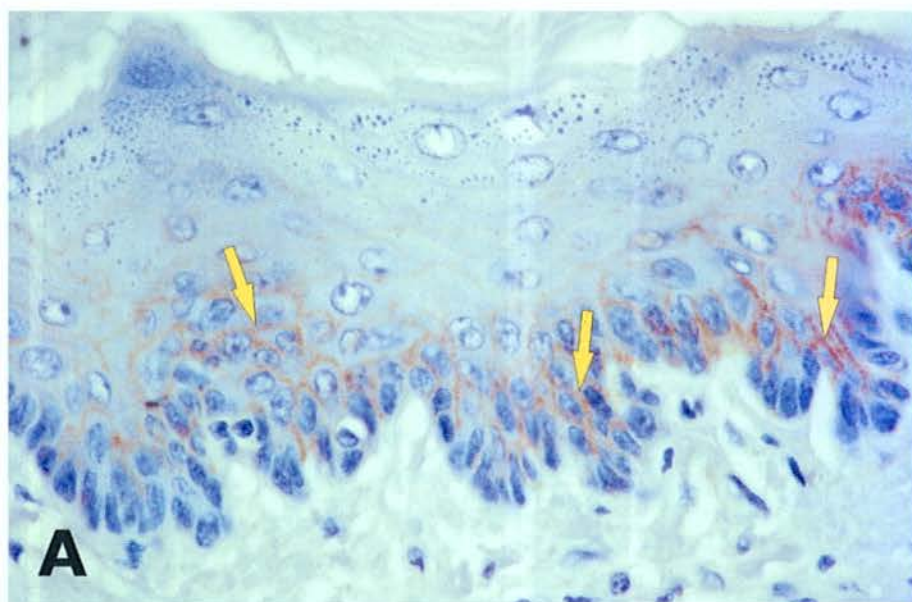


FIGURA 5

LEGENDAS

FIGURA 5 - Imuno-marcação do epitélio de revestimento da mucosa da língua de hamster Sírio dourado, pelo anticorpo β -catenina, através de técnica imunoistoquímica.

- A - Vista geral da imuno-marcação positiva pela β -catenina (setas) na parede da membrana plasmática das células epiteliais nas regiões parabasal e basal. β -catenina 200x**
- B - Início do acúmulo intra-citoplasmático do anticorpo (cabeça de seta) em área de atrofia epitelial focal do epitélio de revestimento. β -catenina 1000x**
- C - Acúmulo intra-citoplasmático do anticorpo e início de marcação em região nuclear (setas) em projeção de cone epitelial. Notar pleomorfismo nuclear em várias células (*). β -catenina 1000x.**



AgNOR

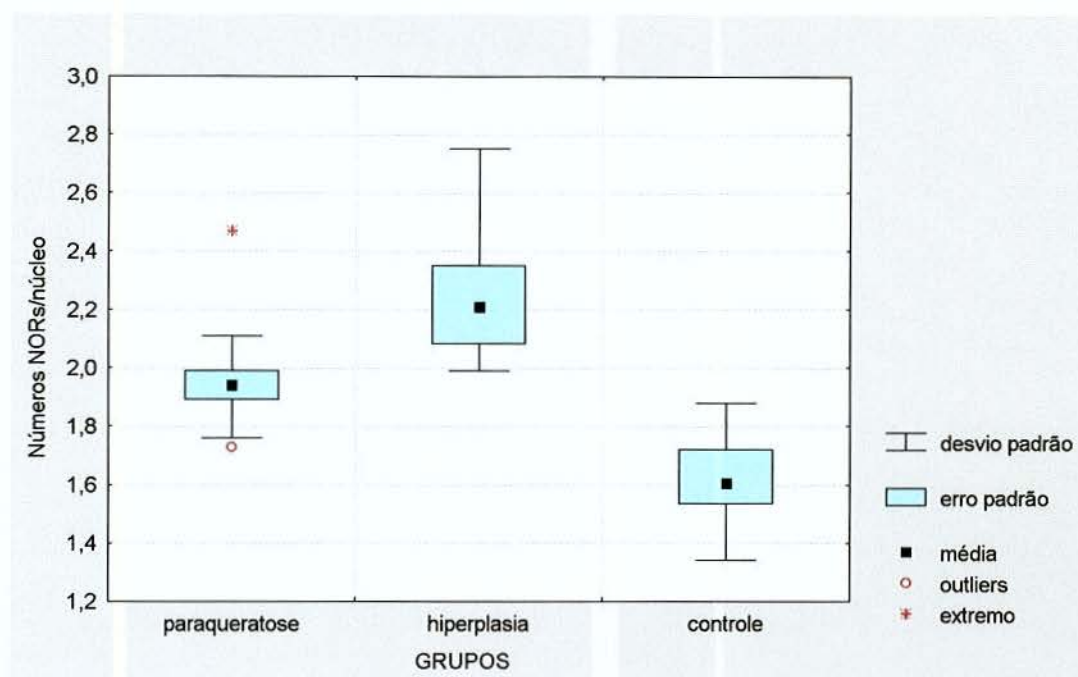


FIGURA 6 - Número médio das NORs/núcleo relativo aos grupos de estudo, hiperplasia e de hiperparaqueratose, com respectivos desvios padrões.

TABELA 1 - Valores médios das NORs/núcleo presentes nos casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e controle.

	hiperparaqueratose (1,9707)	hiperplasia (2,2471)	controle (1,6160)
hiperparaqueratose		,005112*	,000128*
hiperplasia	,005112*		,000125*
controle	,000128*	,000125*	

* diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

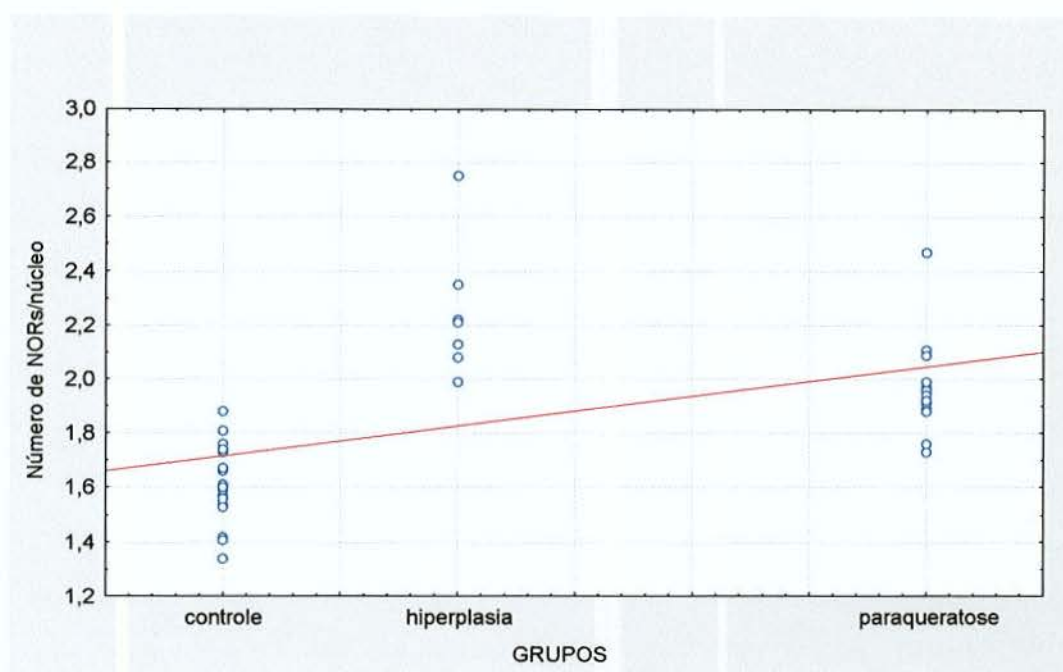


FIGURA 7 - Diagrama de dispersão exibindo reta de dispersão positiva para os valores das médias NORs/núcleo, relativa aos grupos controle, hiperplasia e hiperparaqueratose.

PCNA

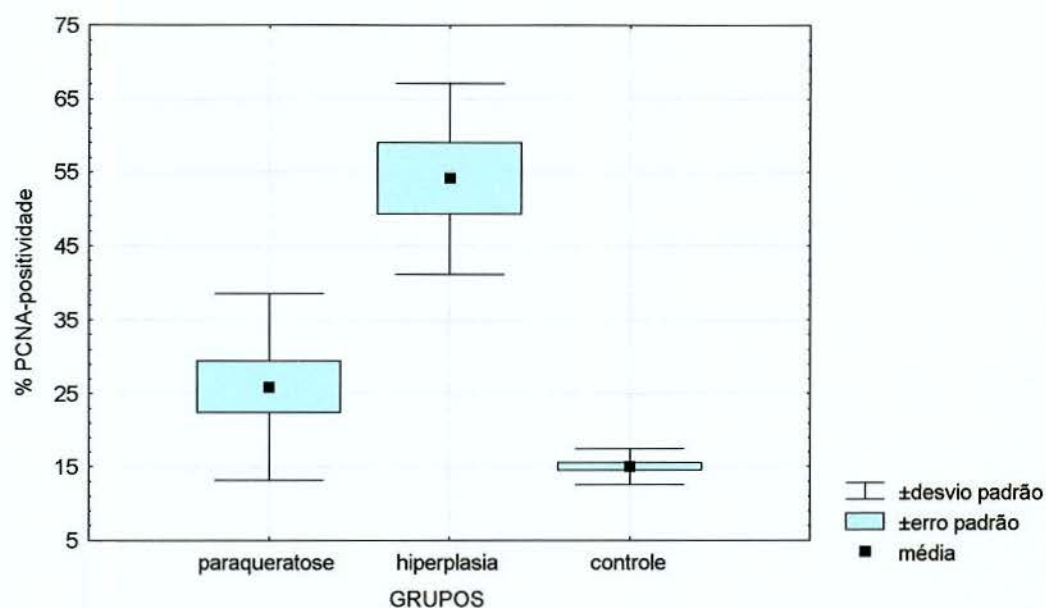


FIGURA 8 - Valores das médias de células PCNA positivas(%), relativos aos grupos de hiperparaqueratose, hiperplasia e grupo controle, com respectivas médias e desvios padrões.

TABELA 2 - Valores médios das células PCNA positivas(%), presentes nos casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e controle.

	hiperparaqueratose (25,84%)	hiperplasia (54,14%)	controle (15,00%)
hiperparaqueratose		,000125*	,005378*
hiperplasia	000125*		,000125*
controle	,005378*	,000125	

* diferença estatisticamente significante $p < 0,05$

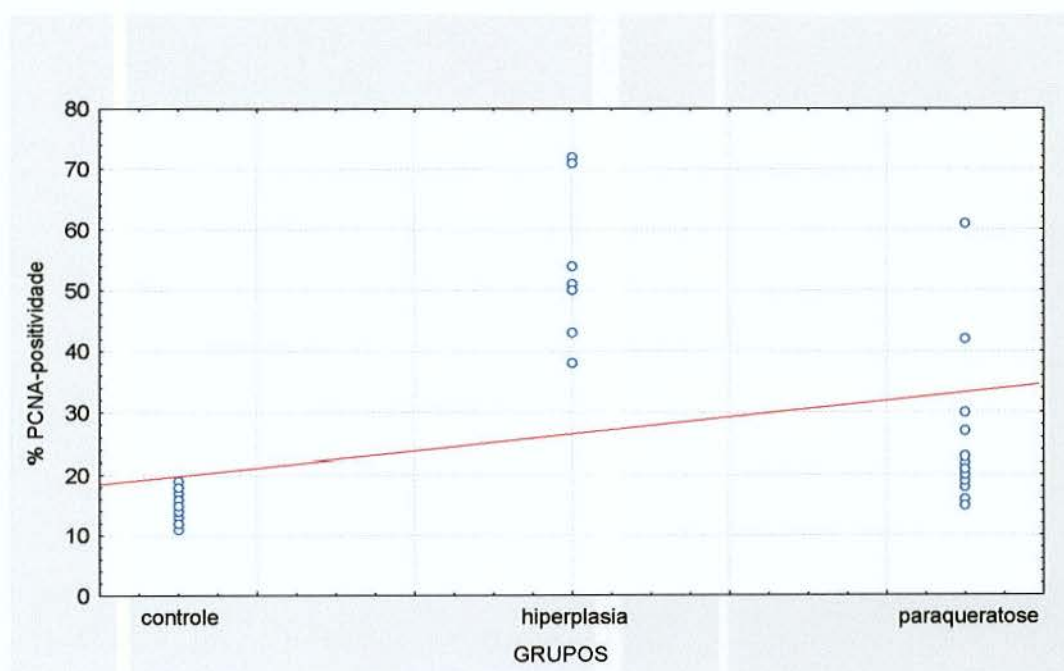


FIGURA 9 - Diagrama de dispersão exibindo reta de dispersão positiva para os valores das médias de células PCNA positivas (%), relativa aos grupos controle, hiperplasia e hiperparaqueratose.

RESUMO DOS RESULTADOS

clínico	GE GC		áreas leucoplásicas / atrofia/ projeções papilíferas epitélio clinicamente normal / áreas leucoplásicas
histológico	GE GC	(n=13) (n=7) (n=20)	hiperparaqueratose 5 hiperplasia papilomatosa + 2 atiplas hiperqueratose, acantose focal discreto infiltrado Inflamatório mononuclear
NORs	GE GC estatística	(n=7) (n=13) (n=20)	2,2471±0,2494 1,9707±0,1843 1,616±0,1368 diferença estatisticamente significativa entre as amostras - p<0,05 correlação positiva - aumento das NORs aumento atividade epitelial
PCNA	GE GC estatística	(n=7) (n=13) (n=20)	54,1428%±10,0054% parabasal, eventual espinhosa, rara na granulosa 25,8461%±12,6941% basal 50% + parabasal 50% 15%±2,4920 somente na basal diferença estatisticamente significativa entre as amostras - p<0,05 correlação positiva - aumento PCNA+ aumento atividade epitelial
β catenina	GE GC	(n=7) (n=13) (n=20)	hiperplasias: diminuição basal/parabasal atiplas: citoplasma/ início nuclear basal / parabasal: descontinua membrana citoplasmática em todo epitélio / basal + parabasal

6 DISCUSSÃO

Estamos ainda muito longe de compreender e controlar todas as variáveis envolvidas no desenvolvimento do câncer, em particular o câncer de boca. Conhecer todos os mecanismos importantes envolvidos no processo de carcinogênese tem sido busca árdua de inúmeros pesquisadores em diferentes países (YAMANAKA et al., 1996; ROSS et al., 1995; BUTLER, 1996; MONRO, 1996; ALBANÊS et al., 1996; SWENBERG, 1993; SHORT, 1993; CUNNINGHAM et al., 1993; IATROPOULOS et al., 1994; WHYSNER & WILLIAMS, 1996; CHU et al., 1997; HERRINGTON et al., 1997; WHYSNER et al., 1994; SILVA et al., 1995; FURIHATA & MATUSHIMA, 1995; QIN et al., 1994; MAGNUSON et al., 1994; YAMANE et al., 1991; OKUZUMI et al., 1992; JAGADEESAN et al., 1994; TANAKA et al., 1994; TANAKA et al., 1995).

Atualmente, o objetivo principal das profissões de saúde tem sido o da prevenção das doenças, e não somente o tratamento. Neste aspecto, os experimentos animais têm auxiliado sobremaneira o entendimento dos mecanismos de prevenção do câncer, sendo uma das ferramentas mais importantes para o estudo sobre a etiologia, patogênese e terapia das mais variadas patologias. No estudo do carcinoma

epidermóide que se desenvolve nas estruturas do epitélio de revestimento bucal não é diferente.

É sabido que algumas neoplasias malignas tem sua etiologia bem relacionada com fatores físicos ambientais, como carcinoma de lábio inferior e radiação UV-B. Outras neoplasias têm estreita correlação com agentes virais, como o Linfoma de Burkitt. Ainda podemos citar aqueles tumores em que vários agentes químicos estão envolvidos com o estabelecimento de neoplasias, e nesse grupo os principais agentes estão relacionados aos produtos da combustão do cigarro e do fumo (BOSSO & FROES, 2002; GUZMAN-SILVA & GUIMARÃES, 1985; BRASILEIRO FILHO et al., 2004).

A associação fumo e álcool têm sido demonstrados ser devastadora no curso de neoplasias malignas. Analisando a literatura disponível, constatamos que modelos experimentais em animais têm sido utilizados a mais de um século, firmando-se como metodologia importante a partir dos estudos de Salley (1954).

A implantação, em nosso laboratório, de metodologia em carcinogênese química experimental com DMBA em modelo animal, com utilização de hamster, camundongos *hairless* e ratos (KITAKAWA, 2003; BOLANHO, 2004; CARMO, 2004; BOLANHO et al., 2005) foi passo inicial para o desenvolvimento de linha de pesquisa nesse campo.

A partir da análise de várias metodologias descritas na literatura, optamos pela aplicação de DMBA em borda lateral esquerda de

língua de hamster, seguindo a metodologia implantada no laboratório descrita por Bolanho et al., em 2005.

Nesta pesquisa, o objetivo foi avaliar os estágios iniciais da carcinogênese, através do uso de anticorpos PCNA e β -catenina, e histoquímica pelo AgNOR. Utilizando metodologia semelhante a usada por Kitakawa (2003), que estudou as alterações clínicas e histoquímica pelo AgNOR até a vigésima sexta semana de aplicação, procuramos analisar somente os primeiros eventos do processo de carcinogênese, delimitando nossa pesquisa até a oitava semana de aplicação do DMBA.

Nossos achados clínicos encontram sustentação com àqueles observados por Kitakawa (2003), como o surgimento de áreas leucoplásicas na região de aplicação do DMBA, por volta da sexta a oitava semana de aplicação. Clinicamente, observamos ainda, a presença em cinco casos, de projeções papilomatosas, fato já anteriormente descrito na literatura em carcinogênese experimental (SALLEY, 1954; KITAKAWA, 2003; CARMO, 2004).

Os dados de crescimento hiperplásico e formação inicial de papilomas em até oito semanas é um padrão já bem estabelecido em carcinogênese experimental, conforme descreveu Salley (1954), quando observou quatro estágios histopatológicos: hiperplasia, papiloma, carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide, após aplicação de DMBA por 16 semanas em bolsa jugal de hamster.

Também foi observada presença de hiperparaqueratose nas regiões do epitélio onde foram realizadas as aplicações de DMBA. Fato também destacado por Kitakawa (2003). Este último observou ainda que o epitélio de revestimento apresentou esse tipo de alteração na camada córnea desde os estágios iniciais (entre a sexta e oitava semanas de aplicação), até o surgimento de carcinomas epidermóides, fato observado entre a vigésima segunda e vigésima sexta semanas de aplicação.

Este achado histopatológico parece ser um indicativo de alteração não somente da maturação epitelial, mas também pode ser utilizado como sinal de alteração no sentido de mudanças fenotípicas de malignidade. De alguma maneira, a presença de hiperparaqueratose parece estar relacionada a um maior potencial de transformação do epitélio. Por enquanto, é um dado especulativo, porém novas pesquisas necessitam ser conduzido para trazerem maiores subsídios acerca desse achado histológico e seu verdadeiro papel prognóstico.

Quanto ao número médio de NORs/núcleo dos casos analisados, observamos que existe um aumento linear progressivo, valores que vão aumentando de áreas histológicas de epitélio controle normal ($1,6160 \pm 0,1368$), passando por áreas de hiperparaqueratose ($1,9707 \pm 0,1843$), até chegarmos em áreas de hiperplasias epiteliais ($2,2471 \pm 0,2494$).

Embora não tenhamos usado uma análise morfométrica das NORs, pudemos constatar visualmente que essas estruturas apresentavam-se de maneira geral mais arredondada e maior nos epitélios controle, tornando-se menores e mais irregulares a medida que caminhávamos no sentido de uma maior atividade proliferativa, como nos dois casos de atipia epitelial focal presentes na amostra. Esses achados mostram semelhança com os encontrados por Carmo (2004); Bolanho (2004) e Kitakawa (2003).

Os tratamentos estatísticos dos dados tabulados, através da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, mostraram existir diferença estatística significativa entre os dados analisados ($p < 0,05$). Frente a esses resultados podemos concluir que a contagem média das NORs/núcleo dos três padrões histológicos observados são estatisticamente diferentes, dado também notado no gráfico da curva de dispersão.

Quanto aos resultados encontrados pela marcação das células epiteliais pelo anticorpo PCNA, vale ressaltar que no grupo controle ($15\% \pm 2,4920\%$), a marcação restringiu-se a camada basal, com rara marcação em células da camada parabasal. Já nos casos de hiperparaqueratose, a marcação pelo PCNA ($25,8461\% \pm 12,6941\%$) ficou igualmente dividida entre a camada basal e a camada parabasal. A positividade do PCNA, nos casos de hiperplasia papilomatosa foi a que

apresentou maiores índices ($54,1428\% \pm 10,0054\%$), grupo que incluiu os dois casos de atipia epitelial focal.

O tratamento estatístico da marcação pelo PCNA revelou existir diferença estatisticamente significativa entre os três aspectos histopatológicos analisados. Podemos interpretar, através da observação da curva de dispersão, que da mesma maneira com que ocorreu com a análise das NORs, a média de marcação dos núcleos das células epiteliais pelo PCNA aumentou conforme o quadro histopatológico seguia em direção a quadros de maior atividade celular, bem como de alteração de atipia celular.

Os dois dados analisados em conjunto, AgNOR e PCNA, se completam, e embora a metodologia pelo AgNOR quando utilizada isoladamente não possa ser interpretadas unicamente como marcador de proliferação celular, possuiu um perfil semelhante ao da marcação pelo PCNA. Neste caso, a marcação pelo AgNOR pode ser interpretada como marcador de proliferação celular.

Os casos marcados pelo anticorpo β -catenina não foram analisados de maneira quantitativa. Neste ponto, é importante deixar claro que uma análise qualitativa desse anticorpo trouxeram resultados muito mais expressivos.

Nossa análise revelou que os casos do grupo controle exibiram marcação da proteína β -catenina somente nas membranas citoplasmáticas, mostrando forte marcação entre as células epiteliais.

Essa marcação apresentou-se distribuída por todas as camadas do epitélio, entretanto, sendo mais uniforme nas camadas basal e parabasal.

No grupo de estudo, os casos de hiperparaqueratose, exibiram marcação na membrana citoplasmática, entretanto, esta marcação restringiu-se principalmente as células da camada basal e parabasal, de forma descontínua. Nos casos de hiperplasia papilomatosa, a marcação na membrana citoplasmática diminui e pudemos observar início de discreta marcação próxima ao núcleo destas células. Nos casos de atipia celular, a marcação nuclear era mais pronunciada, porém alguma marcação de membrana citoplasmática ainda podiam ser notadas.

Este padrão de marcação também foi observado por Pinto Jr (2003), que aventou a possibilidade de que a expressão da β -catenina no citoplasma das células neoplásicas, de alguma forma, evidenciaram alguma desregulação do complexo de degradação da β -catenina, tornando as células mais predispostas a divisão celular. Já em relação ao acúmulo nuclear da β -catenina, o autor acredita que este fato, juntamente com a expressão citoplasmática, foi seu resultado mais expressivo.

Devemos salientar que, os dados relativos a marcação da β -catenina, juntamente com àqueles observados pelo AgNOR e pelo PCNA, demonstraram serem úteis no estudo de carcinogênese quimicamente induzida, podendo ser utilizados como fator prognóstico em áreas leucoplásicas.

Para finalizar, gostaria de ressaltar que durante esta pesquisa, embora o modelo de carcinogênese esteja bem estabelecido, a obtenção de anticorpos específicos para utilização em hamsters nem sempre foi tarefa fácil. Vários anticorpos foram testados, sem entretanto, apresentarem resultados conclusivos. A não marcação destes anticorpos nem sempre significou que a proteína ou proteínas de interesse não estivesse presente no material analisado. Por outro lado, a marcação de alguns anticorpos deve também ser analisada com muita cautela, para não incorrerem em falsos positivos.

Trabalhar com painéis imunoistoquímicos, bem como a interpretação de seus resultados, requerem profissional bem treinado e experiente.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com a utilização dos marcadores imunoistoquímicos PCNA e da β -catenina, comparativamente com a marcação histoquímica pelo AgNOR, na etapa inicial do processo de carcinogênese em borda lateral de língua de hamsters, foi possível concluir que:

- a) a associação da técnica pelo AgNOR e a imunoistoquímica pelo PCNA refletiu a maior atividade proliferativa das células analisadas
- b) o modelo de carcinogênese experimental em borda lateral de língua de hamster é uma metodologia que se presta para estudo por imunoistoquímica
- c) os anticorpos PCNA e β -catenina podem ser utilizados, nos casos leucoplasia, para analisar áreas com maior potencial de transformação maligna.

8 REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS¹

1. Albanes D et al. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung-cancer incidence in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. Effects of base-line characteristics and study compliance. **J. Natl. Cancer Inst.** 1996; 88: 1560-70.
2. Allison RT, Best T. p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry. **J. Oral Pathol. Med.** 1998; 28: 434-440.
3. Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **Eur J Canc** 2000; 36: 1607-20.
4. Behrens J et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature** 1996; 15: 638-42.
5. Birchall MA et al. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplasic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, *in vivo* study. **Oral Oncol.** 1997; 33: 419-25.

¹ De acordo com Estilo Vancouver – Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

6. Bolanho A et al. Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster. **Rev Odontol UNESP** 2005; 34: 129-33.
7. Bolanho A. **Terapia fotodinâmica experimental em língua normal de hamster: análise histológica e histomorfométrica das alterações teciduais provocadas por laser compacto de diodo (630nm)**. São José dos Campos. 2004. 82p. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.
8. Bosso RMV, Froes NDT. Origem das mutações. In: Luoro ID et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo. MSG Produção Editorial, 2002. Cap.2, p.5-30.
9. Brasileiro-Filho G. **Bogliolo: Patologia Geral**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 367p., 2004.
10. Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. **Curr Opin Oncol** 1998, 10: 81-7.
11. Butler WH. A review of the hepatic tumors related to mixed-function oxidase induction in the mouse. **Toxicol Pathol** 1996; 24: 484-92.

12. Cabrini RL et al. Morphometric stud of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.** 1992; 21: 275-79.
13. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes Dev.**1997; 11: 3286-3305.
14. Carmo ED. **Carcinoma epidermóide induzido quimicamente pelo DMBA em pele de camundongos *hairless*: estudo clínico, histológico e histoquímico.** São José dos Campos. 2004. 81p. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.
15. Castilho RM. **Transcrição epitélio-mesenquimal em carcinomas epidermóides bucais. Análise através da expressão das proteínas CTBP, Vimentina e β -Catenina e da identificação gênica em larga escala.** São Paulo. 2003. 96p. Dissertação (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
16. Chu M, Rehfeld JF, Borch K. Chronic endogenous hypercholecystokininemia promotes pancreatic carcinogenesis in the hamster. **Carcinogenesis** 1997; 18: 315-20.

17. Coltrera MD et al. Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. **Am J. Pathol.** 1992; 141: 817-25.
18. Crawford HC et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. **Oncogene** 1999; 18: 2883-91.
19. Crocker J. Nucleolar organizer regions. In: Pathology of the nucleus. **Curr Top Pathol** 1990; 82: 92-149.
20. Cunningham ML, Elwell MR, Matthews HB. Site-specific cell proliferation in renal tubular cells by the renal tubular carcinogen tris(2,3dibromopropyl)phosphate. **Environ. Health Perspect.**1993; 101:253-57.
21. Dachi SF. Experimental production of carcinomas of the hamster tongue. **J. Dent. Res.**1967; 46: 46.
22. de Rosa L et al. Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. **J. Oral Pathol. Med.** 1999; 28: 252-8.
23. Derenzini M, Pession A, Thire D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab. Invest.**1990; 63: 137-40.

24. Donofrio V et al. Prognostic evaluation of HPV-associated precancerous and microinvasive carcinoma of the buccal cavity: combined use of nucleolar organizer regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Eur. J. Cancer, B, Oral Oncol.**1995; 31: 174-80.
25. Eaton S & Cohen S. Wnt signal transduction: more than one way to skin a(b-) cat? **Trends Cell Biol.** 1996; 6: 287-90.
26. Eveson JW, MacDonald DG. Hamster tongue carcinogenesis. I Characteristics of experimental model. **J. Oral Pathol.**1981; 10: 322-31.
27. Farnousch A, Mackenzie IC. Sequential histological changes and mast cell response in skin during chemically-induced carcinogenesis. **J. Oral Pathol.**1983;12: 300-6.
28. Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. **Rev Odontol USP** 1993; 7: 285-91.
29. Frank LM, Teich N. **Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer.** 1990, Livraria Rocca. São Paulo.
30. Fujita K et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site formation. **J. Dent. Res.**1973; 52: 1177-85.

31. Fujita K et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. **J. Dent. Res.** 1973; 52: 327-32.
32. Furihata C, Matushima T. *In vivo* short-term assays for tumor initiation and promotion in glandular stomach of Fischer rats. **Mutat. Res.** 1995; 399:15-35.
33. Gimenez-Conti B, Slaga TJ. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. **J. Cell. Biochem.** 1993; 17: 83-90.
34. Gomes APN. **Expressão imuno-histoquímica de proteínas da membrana basal e β -catenina em lesões bucais potencialmente malignas.** São Paulo. 2001. 100p. Dissertação (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
35. Gradl D, Kuhl M, Wedlich D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. **Mol. Cell. Biol.** 1999; 19:5576-87.
36. Guzman-Silva MAG, Guimarães JSP. Carcinogênese química cutânea. **Rev Brás Cancerl** 1985; 31: 285-91.
37. Haertel WM et al. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.** 2000; 275: 32046-51.

38. He TC et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 1998; 281: 1509-12.
39. Heller B et al. A modified method of carcinogenesis induction in DMBA hamster cheek pouch model of squamous neoplasia. **Am. J. Surg.** 1996; 172: 678-80.
40. Herrington et al. Effects of high-fat diet and cholecystokinin receptor blockage on promotion of pancreatic ductal cell tumors in the hamster. **Nutr cancer** 1997; 28: 219-24.
41. Howat et al. Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanomas. **Cancer** 1989; 63: 474-8.
42. Howe LR et al. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. **Cancer Res.** 1999; 59: 1572-7.
43. Huang WK et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC 10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 1994; 78: 748-54.
44. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. **Cell** 1997; 90: 871-82.

45. Iatropoulos et al. Urinary bladder hyperplasia in the rat: non-specific pathogenetic considerations using a beta-lactam antibiotic. **Exp Toxicol Pathol** 1994; 46: 265-74.
46. Ikeda S et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. **EMBO J** 1998; 17: 1371-84.
47. Jagadeesan V, Rao NJ, Sesikeran B. Effect of iron-deficiency on DMH-induced gastrointestinal-tract tumors and occurrence of hepatocyte abnormalities in Fischer rats. **Nutr cancer** 1994; 22: 285-91.
48. Jankowski JA et al. Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. **Mol. Pathol.** 1997, 50: 289-90.
49. Johansson et al. Promoting effect of snuff in rats initiated by 4-nitroquinoline-N-oxide or 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Cancer Res.** 1991; 4388-94.
50. Johansson et al. Snuff-induced carcinogenesis: effect of snuff in rats initiated with 4-nitroquinoline-N-oxide. **Cancer Res.** 1989; 3063-69.

51. Khan MA et al. Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. **J. Oral Pathol. Med.** 1993; 22: 257-62.
52. Kitakawa D. **Utilização da AgNOR no processo de carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) em bora lateral de língua de hamsters sírio dourado (*Mesocricetus auratus*).** 2003. 130p. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, São Paulo.
53. Kligman AM. Origin of the annual symposium on the biology of skin. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.** 2002; 7: 1-3.
54. Kobayashi I et al. The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region staining. **Hum. Pathol.** 1995; 26: 907-13.
55. Lan HA et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa – a marker for poor tumor differentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness. **Anti Cancer Res.** 1996; 16: 3059-65.

56. Levesque G et al. Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and beta-catenin. **J. Neurochem.**1999; 72: 999-1008.
57. Magnuson BA, Shirliff N, Bird RP. Resistance of aberrant crypt foci to apoptosis induced by azoxymethane in rats chronically fed cholic acid. **Carcinogenesis** 1994; 15: 1459-62.
58. Mann B et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**1999; 16: 1603-8.
59. Marefat P, Shklar G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**1977; 44: 578-86.
60. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology** 1992; 21: 591-94.
61. Miller JR, Moon RT. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. **Genes Dev.**1996; 15: 2527-39.
62. Molenaar M et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell** 1996; 86: 391-9.

63. Monro A. Are life-span rodent arcinogenicity studies defensible for pharmaceutical agents? **Exp Toxicol Pathol**1996; 48: 155-66.
64. Nishimura M et al. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. **Nat. Med.**1999; 5: 164-9.
65. Nunes FD. **Leucoplasia Bucal: estudo morfológico, imunohistoquímico e histoquímico.** São Paulo. 1991. 85p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
66. Ofner D et al. Silver stained nucleolar organizer regions proteins (AgNORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. **J. Pathol.** 1990; 162: 43-9.
67. Okuzumi et al. Palm carotene inhibits tumor-promoting activity of bile-acids and intestinal carcinogenesis. **Oncology** 1992; 49: 492-97.
68. Pinto Jr. DS. **Expressão e participação da β -Catenina em carcinomas epidermóides bucais. Análise tecidual e em cultivo celular.** São Paulo. 2003. 84p.Tese (Livre-Docência em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

69. Qin et al. DNA adduct formation and assessment of aberrant crypt foci *in vivo* in the rat colon mucosa after treatment with N-methyl-N-nitrosourea. **Carcinogenesis** 1994; 15: 851-55.
70. Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev Bras Pat Clín** 1994; 40: 141-7.
71. Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Marcadores da proliferação celular. **Rev Bras Pat Clín** 1993; 29: 24-9.
72. Rosa LEB, Jaeger MMM, Jaeger RG. Morphometric study of nucleolar organizer regions in ameloblastoma and basal cell carcinoma. **Oral Oncol.**1999; 33: 209-14.
73. Ross et al. Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels. **Cancer Res.**1995; 55: 1039-44.
74. Rowe NH et al. A study of environmental influence upon salivary gland neoplásica in rats. **Cancer** 1970; 26: 436-44.
75. Salley JJ. Effect of mineral oil as a solvent for 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. **J. Dent. Res.**1955; 34: 723.
76. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **J. Dent. Res.**1954; 33: 253-62.

77. Salley JJ. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. **J. Dent. Res.** 1957; 36: 48-55.
78. Sano K et al. Prognostic implication of silver binding nucleolar organizer regions (AgNOR) in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.** 1991; 20: 53-6.
79. Sheehan R, Shklar G. The effect of cyclophosphamide on experimental salivary gland neoplasia. **Cancer Res.** 1972; 32: 420-25.
80. Shin DM et al. Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. **J. Natl. Cancer Inst.** 1993; 85: 971-78.
81. Shklar C, Turbiner S. Effects of Fluorouracil on carcinogenesis of rat submandibular glands. **J. Dent. Res.** 1971; 50: 985.
82. Short BG. Cell proliferation and renal carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.** 1993; 101:115-20.
83. Shtutman M et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1999; 96: 522-7.

84. Silva et al. Effects of dietary N-3, N-6 and N-9 polyunsaturated fatty-acids on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in C57BL6J mice. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids** 1995; 53: 273-77.
85. Solt DB, Polverini PP, Calderon L. Carcinogenic response of hamster buccal pouch epithelium to 4 polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Oral Pathol.** 1987; 16: 294-302.
86. Swenberg JJ. Alpha(2 μ)-globulin nephropathy review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications of human risk assessment. **Environ. Health Perspect.** 1993; 101:39-44.
87. Tanaka T et al. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally-occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. **Cancer Res.** 1995; 4059-64.
88. Tanaka T. Cancer chemoprevention by natural products (Review). **Oncol Reports** 1994; 1: 1139-55.
89. Tao YS et al. Beta-Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a non-cadherin complex. **J Cell Biol** 1996; 134: 1271-81.
90. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature** 1999; 398: 422-6.

91. There D. AgNOR staining and quantification. **Micron** 2000; 31: 12731.
92. Walker RA. The Histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. **Histopathology** 1988; 12: 221-3.
93. Whysner et al. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach. **Food Chem. Toxicol.** 1994; 32: 215-22.
94. Whysner J, Williams GM. Butylated hydroxyanisole mechanistic data and risk assessment - conditional species-specific cytotoxicity, enhanced cell-proliferation, and tumor promotion. **Pharmacol. Ther.** 1996; 71: 137-51.
95. Wielenga VJ et al. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. **Am J. Pathol.** 1999; 154: 515-23.
96. Yamanaka et al. Exposure to dimethylarsenic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, strongly promotes tumorigenesis initiated by 4-nitroquinoline-1-oxide in the lungs of mice. **Carcinogenesis** 1996; 17: 767-70.
97. Yamane et al. The effect of interferon on carcinogenesis by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the duodenum of mice. **Jpn. J. Cancer Res.** 1991; 82: 470-75.

98. Yang P, Huang GS, Zhu XS. Role of nucleolar organizer regions in the differentiating malignant from benign tumours of the colon. **J Clin Pathol** 1990; 43: 235-8.

ROSA LEB. **EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA), β -CATENIN, AND AgNOR, DURING THE EARLY STAGE OF CARCINOGENESIS PROCESS CHEMICALLY INDUCED BY DMBA, ON THE TONGUE LATERAL BORDER IN GOLDEN SYRIAN HAMSTER (*Mesocricetus auratus*).** 2006, 104f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

ABSTRACT

The oral cancer model in hamsters shows many similarities with developmental oral cancer in humans. The proliferating capacity is one the most characteristics of neoplásica cells and detection of these cells allow us, throughout of its counting, to achieve an estimated tumour growing index, with a consequent repercussion about prognostic and in the treatment of those lesions. 40 golden Syrian hamsters, both genders, aged between two to six month and weight 150g in average were used. The left side of tongue of each animal was painted for eight consecutive weeks, with a solution of DMBA. Tongues were removed, fixed in 10% buffered formal solution. The histological slides were stained by AgNOR technique and by PCNA and β -catenin immunohistochemical antibodies. Statistical analyzes were performed by ANOVA one-way test and Tukey test. We may conclude that an association between AgNOR and PCNA might indicate the higher proliferating activity of the analyzed cells. The experimental carcinogenesis model in hamster tongue is an available methodology for immunohistochemistry study. And finally, PCNA and β -catenin immunohistochemical antibodies may be used to analyze possible premalignant areas in oral leukoplakia.

KEY WORDS: PCNA, β -catenin, immunohistochemistry, chemical carcinogenesis, golden Syrian hamster.

Anexo 1 – Tabelas geradas após tratamento estatístico ANOVA utilizados neste trabalho.

TABELA 3 - Valores relativos a análise estatística(ANOVA) das médias de NOR/núcleo, relativo aos casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e grupo controle.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
paraqueratose	13	25,62	1,9707	0,03397
hiperplasia	7	15,73	2,2471	0,00622
controle	20	32,32	1,6160	0,01872

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F-crítico</i>
Entre grupos	2,3860623	2	1,9707692	38,8330	8,17E-10	3,251924
Dentro dos grupos	1,1367151	37	0,030722			
Total	3,5227775	39				

TABELA 4 - Valores relativos a análise estatística(ANOVA) das médias do número de células PCNA-positivas(%), relativo aos casos de hiperparaqueratose, hiperplasia e grupo controle.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
paraqueratose	13	336	25,8461	161,1410
hiperplasia	7	379	54,1428	169,1428
controle	20	300	15	6,2105

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F-crítico</i>
Entre grupos	7948,8255	2	3974,4127	47,9539	5,32E-11	3,251923
Dentro dos grupos	3066,5494	37	82,8797			
Total	11015,375	39				

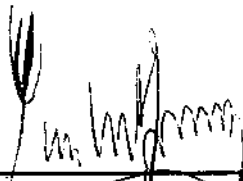
Anexo 2 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 024/2000-PA/CEP, sobre “Análise comparativa das alterações epiteliais quimicamente induzidas por DMBA na língua de Hamsters Sírios dourados (*mesocricetus auratus*), através da dupla marcação imunohistoquímica pelo PCNA e p53 e histoquímica pelo AgNor”, sob a responsabilidade de **Luiz Eduardo Blumer Rosa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2000.



Prof. Dr. Paulo Villela Santos Júnior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo 3. Descrição da metodologia argirofílica proposta por Ploton et al. (1986), utilizada neste experimento para marcação das regiões organizadoras nucleolares (NORs).

1.	estufa à 57°C	desparafinização xilol	30 minutos	
2.	temperatura ambiente	desparafinização xilol	20 minutos	
3.	etanol absoluto	desidratação	20 minutos	
4.	imersão	solução de ácido acético e etanol (1:3)	5 minutos	
5.	lavagem	etanol absoluto	3 vezes	
6.	imersão	celuidina a 1% etanol/éter (1:1)	1 minuto	
7.	retirada do excesso	secagem da lâmina temperatura ambiente	1 hora	
8.	imersão	etanol a 70%	5 minutos	
9.	lavagem	água destilada	3 vezes	
10.	incubação câmara úmida	solução de nitrato de prata 50%, misturada à solução de gelatina em ácido fórmico aquoso a 1% na proporção de 2:1	35 minutos estufa à 40°C	
11.	lavagem	água destilada	40°C	
12.	lavagem	água destilada	temperatura ambiente	
13.	desidratação	etanol	concentrações crescentes	
14.	clareamento	xilol		
15.	montagem	Permunt®		

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

São José dos Campos, 13 de abril de 2006.

Prof.Dr. LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA