

*KARINA ANTUNES NEVES*

**EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO PELA  
CICLOSPORINA A (CsA) SOBRE A CARCINOGENESE  
PELO 4NQO NOS TECIDOS BUCAIS DE RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção de  
grau de Mestre em Estomatopatologia,

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

Piracicaba  
2002

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL**

KARINA ANTUNES NEVES

**EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO PELA  
CICLOSPORINA A (CsA) SOBRE A CARCINOGENESE PELO  
4NQO NOS TECIDOS BUCAIS DE RATOS**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCEG-036/83  
Doc. 17 / 05 / 2002  
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção de grau  
de Mestre em Estomatopatologia,

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Bennati Neto  
Prof. Dr. Heron Fernando de Sousa Gonzaga  
Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório

Piracicaba  
2002

UNIDADE BC  
CHAMADA TI/UNICAMP  
N414e  
EX  
OMBO BC/ 49637  
ROC 16-837102  
DX  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 14/06/02  
Nº CPD

CM00169243-5

BIB ID 245745

### Ficha Catalográfica

N414e	Neves, Karina Antunes. Efeito da imunossupressão pela ciclosporina A (CsA) sobre a carcinogênese pelo 4NQO nos tecidos bucais de ratos. / Karina Antunes Neves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002. xxvi, 128p. : il.  Orientador : Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.  1. Câncer. 2. Animais. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Sistema imune. I. Spolidório, Luís Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2002, considerou a candidata KARINA ANTUNES NEVES aprovada.

1. Prof. Dr. LUÍS CARLOS SPOLIDÓRIO

2. Prof. Dr. CARLOS BENATTI NETO

3. Profa. Dra. HERON FERNANDO DE SOUSA GONZAGA

2002 6 5 18

***“Para ser grande, sê inteiro; nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”***

Fernando Pessoa - 1933

Dedico este trabalho,

A **DEUS**, por proporcionar o meu desenvolvimento e guiar meus passos na grande jornada que é a vida.

Aos meus pais, **Maria Inês Antunes Neves e Eraldo Neves**, pelo amor, incentivo e exemplo de vida.

Dedico este trabalho,

Ao meu namorado **Michael Frederico Manzolli Basso**, pela dedicação, amor, paciência e ajuda.

Aos meus irmãos, **André Antunes Neves e Carolina Antunes Neves**, pelo apoio e companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela competência, dedicação, incentivo e apoio.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Wilson Sallum**, pelo acolhimento e contribuição intelectual.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Ricardo Samih Abi Rached**, pela formação e pela utilização de suas dependências no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo companheirismo, estímulo e atenção.

A **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, coordenadora dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pelo apoio.

Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**, coordenador do curso de pós-graduação em Estomatopatologia da FOP/UNICAMP, pela amizade e apoio.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo incentivo e exemplo de pesquisador.

Ao **Prof. Dr. Heron Fernando de Sousa Gonzaga**, do corpo-docente do curso de pós-graduação em Estomatopatologia da FOP/UNICAMP, pela generosidade e amizade.

Aos Professores **Dr. Carlos Bennati Neto**, **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, **Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório** e **Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo companheirismo, apoio e incentivo.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia de Piracicaba **Adriano Luís Martins**, **Ana Cristina do Amaral Godoy**, **João Carlos Gomes da Silva Júnior**, **Maria Helena de Vasconcelos Peron** e **Rosa Maria Fornasiari**, pela colaboração e amizade.

Ao funcionário da Disciplina de Patologia de Araraquara **José Antônio Sampaio Zuanon**, por todo incentivo, amizade e ajuda em todas as fases desse trabalho.

À funcionária da Faculdade de Odontologia de Araraquara **Maria do Carmo Clemente**, pela grande ajuda e companheirismo.

À funcionária da Disciplina de Patologia de Araraquara, **Mônica Campos Borges Comito**, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos de pós-graduação **Ana Lúcia Rangel, Cíntia de Souza Alferes Araújo, Cláudio Maranhão, Danyel Elias da Cruz Perez, Karina Gottardello Zecchin, Marcelo Donizetti Chaves e Paulo Rogério Faria**, por todos os momentos compartilhados e pela grande amizade.

Ao meu namorado **Michael Frederico Manzolli Basso**, pela incalculável ajuda em todos os momentos desse trabalho, sempre com muito carinho e amor.

A minha tia **Rogéria Antunes**, pelo incentivo e exemplo de vida.

Aos meus avós **Antônio Antunes e Asma Azzem Antunes** e minha tia **Flávia Antunes**, por toda a paciência e carinho demonstrados.

À **FAPESP** pela confiança em meu trabalho, concedendo ajuda financeira, através de bolsa (processo: 00/02722-3) e auxílio pesquisa (processo: 00/03543-5).

## SUMÁRIO

<b>1.1- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>01</b>
<b>1.2- RESUMO.....</b>	<b>03</b>
<b>1.3- ABSTRACT.....</b>	<b>05</b>
<b>2.1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2.2- REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1- CICLOSPORINA (CsA) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.1- Indicações terapêuticas da CsA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.2- Mecanismo de ação da CsA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1.3- Efeitos colaterais da CsA.....</b>	<b>16</b>
2.2.1.3.1- <u>Infecções oportunistas</u> .....	17
2.2.1.3.2- <u>Leucoplasia pilosa</u> .....	18
2.2.1.3.3- <u>Neoplasias malignas</u> .....	18
2.2.1.3.4- <u>Neoplasias bucais</u> .....	21
2.2.1.3.5- <u>Epidemiologia das neoplasias pós-transplante</u> .....	22
2.2.1.3.6- <u>Carcinogenicidade da CsA</u> .....	23
<b>2.2.2- CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2.1- DMBA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2.2- Óxido de nitroquinolina (NQO) .....</b>	<b>26</b>
2.2.2.2.1- <u>Método de aplicação do NQO</u> .....	27
2.2.2.2.2- <u>Lesões bucais causadas pelo NQO</u> .....	28

2.2.2.2.3- <u>Aspectos microscópicos das lesões pelo NQO</u> .....	28
2.2.2.2.4- <u>Carcinogênese pelo NQO</u> .....	32
<b>2.3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
2.3.1- ANIMAIS.....	35
2.3.2- CICLOSPORINA.....	35
2.3.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA.....	36
2.3.4- OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	37
2.3.5- OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	39
2.3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>2.4- RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
2.4.1- RATAS.....	43
2.4.1.1- Período de sobrevivência.....	44
2.4.1.2- Ganho de peso.....	45
2.4.2- ASPECTOS MACROSCÓPICOS.....	50
2.4.2.1- Língua.....	50
2.4.2.1.1- <u>Presença de lesões brancas</u> .....	51
2.4.2.1.2- <u>Alteração das papilas linguais</u> .....	52
2.4.2.1.3- <u>Presença de lesões exofíticas</u> .....	53
2.4.2.1.4- <u>Presença de úlceras</u> .....	54
2.4.2.2- Palato.....	59
2.4.2.2.1- <u>Presença de lesões brancas</u> .....	60
2.4.2.2.2- <u>Perda de definição das rugosidades palatinas</u> .....	61

2.4.2.2.3- <u>Presença de lesões exofíticas</u> .....	62
2.4.2.2.4- <u>Presença de úlceras</u> .....	63
<b>2.4.3 ASPECTOS MICROSCÓPICOS</b> .....	<b>66</b>
<b>2.4.3.1- Língua</b> .....	<b>66</b>
2.4.3.1.1- <u>Hiperqueratose e acantose</u> .....	68
2.4.3.1.2 – <u>Displasia leve</u> .....	69
2.4.3.1.3 – <u>Displasia moderada</u> .....	70
2.4.3.1.4 – <u>Displasia severa</u> .....	71
2.4.3.1.5 - <u>Carcinoma microinvasivo</u> .....	72
2.4.3.1.6 – <u>Carcinoma espinocelular grau I</u> .....	73
2.4.3.1.7 - <u>Carcinoma espinocelular grau II e Grau III</u> .....	74
<b>2.4.3.2- Palato</b> .....	<b>78</b>
2.4.3.2.1- <u>Hiperqueratose e acantose</u> .....	79
2.4.3.2.2 – <u>Displasia leve</u> .....	80
2.4.3.2.3 – <u>Displasia moderada</u> .....	81
2.4.3.2.4 – <u>Displasia severa</u> .....	82
2.4.3.2.5 - <u>Carcinoma microinvasivo</u> .....	83
2.4.3.2.5 – <u>Carcinoma espinocelular grau I</u> .....	84
2.4.3.2.6 - <u>Carcinoma espinocelular grau II e Grau III</u> .....	85
<b>2.5- DISCUSSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>2.5.1- RATAS</b> .....	<b>91</b>
<b>2.5.2- CICLOSPORINA A</b> .....	<b>92</b>

<b>2.5.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA.....</b>	<b>93</b>
<b>2.5.4- PERÍODO DE SOBREVIDA.....</b>	<b>94</b>
<b>2.5.5- PESO DOS ANIMAIS .....</b>	<b>95</b>
<b>2.5.6 - ASPECTOS MACROSCÓPICOS.....</b>	<b>96</b>
<b>2.5.7 - ASPECTOS MICROSCÓPICOS .....</b>	<b>98</b>
<b>2.6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>3.1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>

## **1.1- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

4- NQO – 4-nitroquinolina 1-óxido

bFGF - fator básico de crescimento de fibroblastos

c-fos - proto-oncogene da categoria transdutores de sinal

c-myc - proto-oncogene da categoria ativadores da transcrição

c-srs - proto-oncogene da categoria transdutores de sinal

CEC – carcinoma espinocelular

CMV – citomegalovírus

CsA – ciclosporina A

DFA - disqueratode focal acantolítica

DMBA – dimetilbenzantraceno

GVHD- (graft versus host disease) doença do enxerto contra o hospedeiro

H/E- hematoxilina/eosina

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HSV - vírus da herpes simples

IL-2 - interleucina 2

IL-4 - interleucina 4

NaCl - cloreto de sódio

NF-AT – fator de transcrição

NF-IL2A – fator de transcrição

NQO - 4-nitroquinolina 1-óxido

TGF- $\beta$ - fator de crescimento transformador  $\beta$

## **1.2- RESUMO**

A ciclosporina A (CsA) é a principal droga imunossupressora usada na prevenção e tratamento da rejeição de enxertos em transplantes alogênicos. As neoplasias malignas são relatadas entre os efeitos colaterais da CsA. O objetivo deste trabalho foi avaliar a carcinogênese bucal de ratas tratadas diariamente com 10 mg/Kg peso corporal/dia de CsA, por via subcutânea, e que receberam aplicação tópica do carcinógeno óxido de nitroquinolina (4NQO) a 0,5% em propilenoglicol no palato, 3 vezes por semana. O período experimental foi de 240 dias.

O palato e a língua de todas as ratas tratadas com 4NQO ou com a associação de 4NQO e CsA apresentaram alterações tais como, áreas esbranquiçadas, atrofia de papilas e ulcerações. Microscopicamente, foram observadas hiperqueratose, vários graus de displasia epitelial, carcinoma microinvasivo e carcinoma espinocelular grau I. Tanto no palato quanto na língua, as alterações tenderam ser mais pronunciadas ou intensas quando associou-se à carcinogênese o tratamento imunossupressor com a CsA.

### **1.3- ABSTRACT**

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressive agent extensively used for the treatment and prevention of allograft rejection in transplanted recipients. Malignant disease are related between the side effects of CsA treatment.

The aim of this investigation was to evaluate oral carcinogenesis in rats receiving CsA treatment (10 mg/Kg weight/day), and topic applications of the 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) carcinogen 0,5% in propylenoglicol, 3 times a week. The experimental investigation took 240 days.

In all rats treated with 4NQO and with the association of CsA and 4NQO, macroscopic alterations as whitening mucosa, exofitic growth and ulcers were found in palate and tongue.

Microscopically finds were hyperqueratosis, ephitelial dysplasia in several scores, microinvasive carcinoma and invasive squamous cells carcinoma grade I. All the alterations found in this investigation tended to be more pronounced or severe when CsA was associated with 4NQO, in both palate and tongue.

# *Introdução*

## **2.1- INTRODUÇÃO**

A ciclosporina A (CsA) é uma droga imunossupressora amplamente usada principalmente para a prevenção e o tratamento da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos (CALNE et al., 1979; BOREL, 1986).

Entretanto, a CsA produz efeitos colaterais indesejáveis, como a nefrotoxicidade (KAHAN 1989), hepatotoxicidade, hipertensão arterial, hirsutismo (PAGE, 1986; VON GRAFFENRIED, 1986), neurotoxicidade (VON GRAFFENRIED, 1986) entre outros. Dentre os efeitos colaterais da CsA, vários trabalhos na literatura sugerem que pacientes transplantados e imunossuprimidos com CsA tenham uma maior propensão a desenvolver neoplasias malignas, dentre elas linfomas, sarcoma de kaposi e variados carcinomas, entre outros.

Relatos indicam que a CsA pode induzir neoplasias malignas em boca, entre elas lesões linfoproliferativas no seio maxilar (SHIONG et al., 1992) e região de orofaringe (FAIRLEY et al., 1990), carcinoma de células escamosas (KRUPP et al., 1990; REGEV et al., 1992; VARGA et al., 1991 THOMAS et al., 1993) e adenocarcinoma (YAMAMOTO et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da imunossupressão pela CsA no desenvolvimento de lesões na mucosa bucal de ratos, induzidas pelo processo de carcinogênese pelo 4NQO (óxido de nitroquinolina).

# *Revisão da Literatura*

## 2.2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2.1- CICLOSPORINA A (CsA)

#### 2.2.1.1- Indicações terapêuticas da Ciclosporina A (CsA)

A Ciclosporina A (CsA) é um undecapeptídeo cíclico derivado da fermentação dos fungos *Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpun lucidum* (CANAFAX et al., 1983). Descoberta por BOREL (1976), foi inicialmente aplicada como agente antifúngico, mas foi provado que suas atividades antibióticas são insatisfatórias (MORRIS, 1981). Entretanto, BOREL descobriu que a droga induzia um tipo específico de imunossupressão, o que levou a uma rápida expansão nas experiências de seu uso para o tratamento de desordens imunologicamente mediadas, incluindo a inibição da rejeição de órgãos transplantados.

Atualmente, a CsA é amplamente usada principalmente na prevenção e tratamento da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos (CALNE et al., 1979; STARZL et al., 1984; BOREL, 1986; VOLPE et al., 1997; MYRILLAS et al., 1999; NIEH et al., 1999;), principalmente de rim (THE CANADIAN MULTICENTRE TRANSPLANT STUDY GROUP, 1986), fígado (STARZL et al., 1982), coração (HARDESTY et al., 1983), pulmão (KAMHOLZ et al., 1983) e prevenção e tratamento de GVHD (doença do hospedeiro contra o enxerto) nos pacientes que receberam transplante de medula óssea (POWLES et al., 1980 EPSTEIN et al., 1994).

Nos últimos anos o uso da CsA inclui a terapia de uma variedade de desordens imunomediadas. Vários estudos demonstraram que a CsA tem uma eficácia terapêutica no tratamento de pacientes com psoríase severa, levando a uma rápida remissão do quadro clínico (ELLIS et al., 1986; GRIFFITHS et al., 1986; MARKS, 1986; SUGANO et al., 1998).

A CsA também é relatada no tratamento de pênfigo e penfigóide (THIVOLET et al., 1985; BARTHELEMY et al., 1993), penfigóide cicatricial ocular (PALESTINE et al., 1984), dermatite atópica (VAN JOOST et al., 1987), dermatomiosite (EJSTRUT, 1986), lúpus eritematoso sistêmico (FEUTREN et al., 1986; JAMES et al., 1998), esclerose múltipla (MERTIN et al., 1980; JAMES et al., 1998), diabetes melitus tipo I (STILLER et al., 1983), doença de Behçet (NUSSENBLATT et al., 1985), alopecia areata (PARODI et al., 1987), pioderma gangrenoso (ELGART et al., 1991; CARP et al., 1997; HUGHES et al., 2000), micose fungóide (JENSEN et al., 1987; KEMME et al., 1992), síndrome de Sézary (KEMME et al., 1992), esquistossomose (BUEDING et al., 1981), malária (THOMMEN, 1981), colite ulcerativa (GUPTA et al., 1984), sarcoidose pulmonar (REBUCK et al., 1984), asma (SUGANO et al., 1998), artrite reumatóide (MULLER et al., 1979; SUGANO et al., 1998), líquen plano oral (EISEN et al., 1990; HARPENAU et al., 1995; JAMES et al., 1998), citopenia associada a leucemia linfocítica crônica (CORTES et al., 2001), mieloma múltiplo (WIERNIK et al., 1994), miastenia severa (GOULON et al., 1988), piodermatite-pioestomatite vegetante (BRINKMEIER et al., 2001) e linfadenopatia angioimunoblástica com disproteinemia (MURAYAMA et al., 1992).

### **2.2.1.2 – Mecanismo de ação da CsA**

A CsA tem atividade imunossupressora e sugere-se que iniba linfócitos T de uma maneira aparentemente seletiva (YAMADA et al., 1992), com pouca ou nenhuma ativação sobre linfócitos B (SEYMOUR, 1997), não interferindo na resposta humoral.

O mecanismo molecular da CsA está baseado na ligação da droga à ciclofilina – proteína intracelular de ligação da família das imunofilinas. Esta ligação resulta na inibição da calcinerina-fosfatase que é regulada pelo complexo cálcio/calmodulina (CLIPSTONE et al., 1992).

O efeito da CsA no sistema imune ocorre nas células T via inibição de fatores de transcrição específicos, tais como NF-AT e NF-IL2A, os quais regulam a transcrição de genes das citocinas que normalmente estimulam resposta imune, em particular o da IL-2 (CLIPSTONE et al., 1992).

Além da IL-2, a CsA inibe a transcrição de uma variedade de outras citocinas de ativação induzida e proto-oncogenes (c-fos, c-myc, c-srs, IL-4) (RYFFEL, 1992).

No sangue a CsA está ligada a células e lipoproteínas. De 40 a 60% está ligada a eritrócitos e leucócitos, e o restante a lipoproteínas. Menos de 5% da CsA fica livre no plasma (GROEN, 1989; KAHAN, 1989).

Visto que a CsA fica armazenada nos adipócitos, fígado, pulmão, baço e linfonodos (ATKINSON et al., 1982), ocorre sua lenta redistribuição sangüínea após cessar a terapia a longo prazo, mantendo uma baixa concentração sérica por um período de tempo.

A CsA é metabolizada por isoenzimas do sistema enzimático hepático do citocromo P-450 (KAHAN, 1989). 14 metabólitos da CsA são reconhecidos e apresentam substancialmente menor atividade imunossupressora do que a droga nativa, mas eles têm efeitos tóxicos (KAHAN, 1989). 90% destes são excretados do fígado na bile e eliminados nas fezes (BUTTON et al., 1982).

### **2.2.1.3 – Efeitos colaterais da CsA**

A CsA produz efeitos colaterais indesejáveis, sendo o rim e o fígado os órgãos mais afetados (CARP et al., 1997; SEYMOUR et al., 1997).

A nefrotoxicidade da CsA tem sido relatada por vários autores (PALESTINE et al., 1984; PAGE et al., 1986; VON GRAFFENRIED et al., 1986). Segundo KAHAN (1989), o efeito nefrotóxico da CsA ocorre devido a uma vasoconstrição da arteríola aferente, causando a diminuição da taxa de filtração glomerular, redução do fluxo sanguíneo renal e aumento da resistência vascular renal. A longo prazo pode causar hipertensão renal, lipidemia e levar a fibrose intersticial (MATHIESON, 2000). Estes efeitos podem ser reversíveis com a diminuição da dose da droga.

Também foram relatados hepatotoxicidade, hipertensão arterial, fadiga, anemia, hiperuricemia, infecções oportunistas, e hidradenite da axila (PALESTINE et al., 1984; VON GRAFFENRIED et al., 1986). VON GRAFFENRIED et al. (1986) também relataram hirsutismo, hipercalcemia, mialgia e neurotoxicidade.

GIJTENBEEK et al. (1999) descreveram a neurotoxicidade da CsA que pode causar tremor, agitação, insônia, ansiedade, cefaléia, amnésia, confusão,

desorientação, diminuição da sensibilidade (parestesia), alucinações, desmaios, cegueira cortical, fraqueza motora e ataxia.

Também foram relatados aumento gengival (PAGE et al., 1986), anemia aplástica, cirrose hepática, síndrome da angústia respiratória do adulto e diabetes melitus (DALEY et al., 1984; FU et al., 1999; NIEH et al., 1999; SPRATT et al., 1999). A seguir, detalhes de algumas lesões que podem acometer indivíduos imunossuprimidos.

#### 2.2.1.3.1- Infecções oportunistas

Os pacientes imunossuprimidos pela CsA possuem uma maior susceptibilidade a infecções oportunistas por *Citomegalovírus*, *Pneumocystis carinii*, *Candida sp* e infecções no trato urinário, sendo que estas estão relacionadas ao uso prolongado da droga e conseqüente depressão das defesas celulares (MIN et al., 1991).

Os pacientes tratados com CsA também podem ser acometidos por infecções orais, principalmente de origens fúngicas e virais (JOHN et al., 1994; ODOM, 1994; SEYMOUR et al,1997).

A candidose é a implicação mais freqüente de infecção fúngica nestes pacientes (ALLEN et al., 1994; ODOM, 1994; SEYMOUR et al,1997). KING et al. (1994) demonstraram que 10,1% dos paciente transplantados e tratados com CsA apresentaram alguma forma de infecção por *Cândida*.

*Citomegalovírus* (CMV) e vírus da herpes simples (HSV) são os vírus mais freqüentemente envolvidos nas infecções virais de paciente imunossuprimidos pela CsA (KING et al., 1994; SEYMOUR et al., 1997).

#### 2.2.1.3.2- Leucoplasia pilosa

A leucoplasia pilosa, descrita em 1984 (GREENSPAN et al.) parecia estar associada exclusivamente em pacientes com infecção por HIV. Entretanto, vários casos subsequentes foram relatados e confirmou-se que a lesão também ocorre em pacientes transplantados e imunossuprimidos com CsA (GREENSPAN et al., 1989).

KING et al. (1994) encontraram uma incidência de leucoplasia pilosa de 11,3% em pacientes transplantados renais e imunossuprimidos por CsA.

#### 2.2.1.3.3- Neoplasias malignas

A maior susceptibilidade ao desenvolvimento de condições malignas em pacientes transplantados foi introduzida por PENN et al. em 1969.

HARDIE et al. (1980) observaram que lesões malignas se desenvolveram em aproximadamente 45% dos indivíduos transplantados e que receberam terapia imunossupressora sistêmica com várias drogas, dentro de um período de acompanhamento de 10 anos.

OLIVARI et al. (1990) relataram que pacientes transplantados cardíacos recebendo terapia imunossupressora com CsA, apresentaram incidência de 8% de malignidades.

MILAHOV et al. (1996) observaram 48 tumores malignos em 307 pacientes (15,6%) que receberam transplantes de órgãos sólidos e foram submetidos a terapia imunossupressora com CsA.

Segundo PENN (1996), na revisão dos dados do Registro de Tumores em Transplantados de Cincinnati, até 1995, foram relatados 8473 casos de neoplasias malignas em 7938 pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos e foram tratados com CsA e/ou Azatioprina. Dos pacientes tratados com CsA, 1223 eram casos de variados tumores de pele, 889 linfomas, 229 sarcomas de Kaposi, 151 carcinomas renais, 69 carcinomas de útero e 46 carcinomas de vulva e períneo.

As lesões malignas mais comuns em pacientes transplantados e tratados com terapia imunossupressora por CsA são: linfomas, sarcoma de kaposi, canceres de pele e lábio, carcinoma escamoso de colo de útero, vulva e períneo (JACOBS et al., 1981; BIRKELAND, 1983; PENN, 1987).

Os linfomas são as neoplasias malignas mais comuns associadas ao tratamento com CsA em humanos. A incidência anual estimada de linfomas em pacientes transplantados e tratados com CsA é de aproximadamente 1,4 a 3,6% (NALESNIK et al., 1988). WILKINSON et al. (1989) relataram um aumento na incidência de linfomas em pacientes tratados com altas doses de CsA.

MILAHOV et al. (1996) relataram uma incidência de 6,5% de linfomas em pacientes transplantados cardíacos recebendo terapia imunossupressora com CsA.

PENN & BRUNSON (1998) afirmaram que pacientes transplantados e tratados com terapia imunossupressora por CsA têm uma incidência de linfomas 28 vezes maior do que a população normal.

Os tipos de linfomas que mais se desenvolvem em pacientes tratados com CsA são os de células B (KOO et al., 1992), visto que na literatura existem poucos relatos de linfomas de células T associados com terapia com CsA. KOO et al. (1992) relataram caso de linfoma de células B em paciente com psoríase severa tratado com CsA.

O sarcoma de kaposi após transplante de órgãos foi primeiramente descrito por HARWOOD et al. em 1979. BENCINI et al. (1998) descreveram vários casos de sarcoma de Kaposi em pacientes transplantados renais recebendo terapia com CsA.

ECDER et al. (1998) relataram uma incidência de sarcoma de Kaposi de aproximadamente 3% em pacientes transplantados e imunossuprimidos pela CsA.

Há relatos de que o sarcoma de Kaposi em casos de transplante renal, apresenta-se mais agressivo em pacientes medicados com CsA, quando comparado com aqueles sob terapia imunossupressora com outras drogas (BENCINI et al., 1998).

SIEGAL et al. (1990) descreveram o aparecimento de sarcoma de kaposi nos tecidos gengivais de um paciente transplantado renal tratado com CsA, após infecção por citomegalovirus.

QUNIBI et al., (1988) relataram um caso em que o sarcoma de Kaposi desenvolveu-se em aumento gengival induzido por CsA.

Além dos linfomas e sarcoma de Kaposi, há correlação positiva entre o tratamento imunossupressor pela CsA com o desenvolvimento de carcinoma de pele, carcinoma escamoso de colo de útero, vulva e períneo (KINLEN et al., 1979; PENN, 1987). Em um estudo com 842 pacientes com psoríase sob tratamento com CsA, 6 pacientes desenvolveram tumores malignos de pele ou pré-malignos e outros tumores sólidos numa média de 11,2 meses após o início do tratamento com CsA (KRUPP et al., 1990).

#### 2.2.1.3.4- Neoplasias Bucais

Os relatos de que a CsA pode induzir neoplasias malignas incluem vários tipos de tumores que podem acometer diversos locais do organismo, inclusive região de cabeça e pescoço.

Casos de carcinoma de células escamosas em boca foram relatados em pacientes sob terapia imunossupressora por CsA e um dos sítios mais afetados foi o lábio inferior (REGEV et al., 1992; THOMAS et al., 1993).

BALLHAUS et al. (1988) e NAMYSLOWSKI et al. (1994) relataram casos de carcinoma de laringe em pacientes transplantados cardíacos recebendo tratamento com CsA.

BILINSKA-PIETRASZEK et al. (2001) relataram caso de tumor na língua de paciente sob terapia com CsA.

VARGA et al. (1991) descreveram caso de carcinoma que se desenvolveu em hiperplasia gengival induzida por CsA, em paciente transplantado renal recebendo terapia imunossupressora com esta droga.

YAMAMOTO et al. em 1996 relataram caso de adenocarcinoma na mucosa bucal em paciente com psoríase sob tratamento com CsA.

Há também relatos de lesões linfoproliferativas após tratamento com CsA, havendo casos descritos no seio maxilar (KOO et al., 1992; SHIONG et al., 1992) e região de orofaringe (FAIRLEY et al., 1990).

PAN et al. (1995) relataram caso de plasmocitoma extramedular primário em aumento gengival induzido por CsA, em paciente transplantado renal sob terapia imunossupressora com esta droga.

Além disso, SIEGAL et al. (1990) e QUNIBI et al. (1988), relataram casos de sarcoma de kaposi nos tecidos gengivais de pacientes transplantados tratados com CsA, como já descrito anteriormente.

#### 2.2.1.3.5- Epidemiologia das neoplasias malignas pós transplante

A epidemiologia das malignidades em pacientes transplantados e sob terapia imunossupressora devem ser avaliadas com cautela visto que muitas variáveis devem ser consideradas como: tipo de terapia imunossupressora (tratamento com apenas uma ou com associação de várias drogas) , graus de imunossupressão (concentração da droga e período de tratamento imunossupressor) e a variabilidade dos grandes centros em relatar todos os casos (RINALDI et al., 2001).

### 2.2.1.3.6- Carcinogenicidade da ciclosporina A (CsA)

O conceito de vigilância imunológica, isto é, que o sistema imunológico reconhece e destrói as células malignas transformadas, foi primeiramente descrito por BURNET, em 1971.

A evidência mais convincente do papel da resposta imune na proteção contra a transformação maligna é o aumento do número de malignidades em pacientes farmacologicamente imunossuprimidos. Aventa-se várias hipóteses que podem contribuir para o aumento do risco de câncer nestes pacientes. Nesse sentido, sugere-se que a imunossupressão, danificando a imunovigilância, pode ser um importante fator, mas tais danos podem resultar em um aumento em todos os tipos de malignização. Como apenas alguns tipos de tumor têm uma frequência maior em pacientes transplantados, outros fatores podem estar envolvidos.

Outra hipótese é que a estimulação antigênica crônica da presença do “transplante” pode contribuir para aumentar a frequência dos processos malignos nos pacientes transplantados ( BIRKELAND, 1983).

Deve-se considerar também o papel dos oncogenes virais nos pacientes transplantados imunossuprimidos que são mais susceptíveis às infecções virais, no geral. As várias malignizações citadas são aquelas em que os vírus oncogênicos são considerados por desempenhar um importante papel na sua etiopatogenia (HARRIS et al., 1981; COX et al., 1991).

Por outro lado, demonstrou-se aumento na expressão do fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e seus receptores na lâmina própria de hiperplasia gengival induzida por

imunossupressores (SAITO, 1999). Do mesmo modo, JAMES et al. (1998) verificaram aumento da expressão de TGF- $\beta$  em hiperplasia gengival induzida por CsA.

TGF- $\beta$  e bFGF e seus receptores foram encontrados em tumores malignos (KAI et al., 1996; MYOKEN et al., 1996) os quais preenchem funções importantes para invasão e metástase (KENOW et al., 1995; WRIGHT et al., 1996).

HOJO et al. (1999) demonstraram que células neoplásicas expostas à CsA "in vitro" dividem-se mais facilmente, apresentam mudanças na forma, demonstram mobilidade aumentada e, ao contrário das células normais, podem crescer sem estarem ancoradas a uma superfície sólida. Além disso, quando os autores injetaram diferentes tipos de células tumorais em ratos imunossuprimidos pela CsA, outros tumores secundários se desenvolveram nos pulmões na presença de CsA, o que não ocorreu na ausência da mesma. Em estudos "in vivo" com camundongos, estes autores sugerem que a CsA promove crescimento tumoral por um mecanismo autônomo, independente de qualquer efeito do sistema imune. Eles relataram que a CsA promove a transcrição e expressão do gene do TGF- $\beta$ , e este promove a invasão e metástase de células tumorais. Além disso, eles demonstraram que as lesões eram prevenidas quando os animais foram tratados com anticorpos monoclonais direcionados ao TGF- $\beta$ .

Além disso, HERMAN et al. (2001) demonstraram que a capacidade de reparo do DNA foi reduzida significativamente pela CsA, em estudos "in vivo" e "in vitro". Neste estudo, foram comparadas amostras de pacientes normais (controle),

pacientes transplantados tratados com azatioprina e prednisona (terapia dupla) e pacientes transplantados tratados com azatioprina, prednisona e CsA (terapia tripla). O reparo do DNA no grupo de pacientes recebendo a terapia tripla (com CsA) foi de  $679 \pm 64$  cpm/ $10^6$  células, significativamente menor que no grupo controle com  $1049 \pm 69$  cpm/ $10^6$  células. Nos pacientes recebendo terapia dupla o reparo do DNA foi similar ao grupo controle. No estudo "in vitro", HERMAN et al. (2001) mostraram que a CsA leva a uma diminuição significativa do reparo do DNA quando comparada ao controle e ao tratamento com azatioprina e prednisona, sejam elas administradas isoladamente ou associadas.

Apesar de existirem alguns relatos clínicos, há escassez de informações sobre a associação da CsA e desenvolvimento de câncer bucal. Hoje, com o desenvolvimento de serviços especializados em transplantes e concomitante tratamento desses pacientes com a CsA, é importante a investigação da associação dessa droga com o câncer bucal.

## **2.2.2- CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL**

### **2.2.2.1- DMBA (dimetilbenzantraceno)**

O primeiro modelo bem sucedido de carcinogênese bucal em animais experimentais foi descrito por SALLEY em 1954, consistindo na aplicação de um hidrocarboneto policíclico aromático – DMBA (dimetilbenzantraceno) a 0,5%, diluído em acetona, na bolsa da bochecha de hamster. Este modelo foi utilizado por muitos autores (FUJITA et al., 1973; HASSAN et al., 1985). Entretanto, este

modelo é questionável pois a bolsa de hamster tem estrutura diferente da mucosa bucal. Quando o DMBA foi usado na mucosa bucal de outros animais, não houve desenvolvimento de carcinoma com a mesma frequência (SANTOS, 1999).

#### **2.2.2.2- 4NQO (4-nitroquinolina-1-óxido)**

O 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), um potente agente carcinogênico, foi sintetizado por OCHIAI et al. em 1943 a partir de uma quinolina que ao reagir com peróxido de hidrogênio, incorpora um radical nitro (NAKAHARA et al., 1957). O 4NQO sofre ativação metabólica no organismo transformando-se então em carcinógeno (BOYD & READE, 1988). Enzimas do tipo hidroxilase convertem o 4-nitroquinolina-1-óxido em 4-aminoquinolina-1-óxido (SUGIMURA et al., 1965). Estes derivados do 4NQO induzem mutação em bases nitrogenadas, deleções, conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (NAGAO & SUGIMURA, 1976).

Em 1957, NAKAHARA et al. causaram carcinoma de pele em camundongos pincelados com 4NQO. Em 1965, FUJINO et al. aplicaram 4NQO no lábio de camundongos e descreveram carcinomas de lábio e de língua.

O modelo experimental de carcinogênese bucal com 4NQO tornou-se mais usado quando, em 1973, WALLENIS & LEKHOLM introduziram o uso da nitroquinolina (4NQO) diluída a 0,5% em propilenoglicol na boca de ratos. A nitroquinolina é hidrossolúvel e, quando aplicada no palato de ratos provoca a formação de carcinomas no palato e na língua. Juntamente com o DMBA na bolsa

de hamster, é o modelo mais usado para o estudo da carcinogênese bucal em animais de experimentação.

#### 2.2.2.2.1- Método de aplicação do 4NQO

O 4NQO na boca foi inicialmente usado a 0,25% em benzeno no lábio de camundongos (FUJINO et al., 1965). Para o estudo de carcinomas de boca, o 4NQO é geralmente usado a 0,5% em propilenoglicol e aplicado com auxílio de pincel no palato de ratos, 3 vezes por semana (WALLENIOUS & LEKHOLM, 1976).

O 4NQO também pode ser usado na água de beber a 0,001% (KITANO et al., 1992) ou na concentração de 5, 10 e 20 ppm (TANAKA et al., 1986, 1990, 1995).

A concentração, assim como o período de aplicação do 4NQO modificam a quantidade e o tempo de formação das lesões (SVENSSON & HEIDEN, 1982).

SVENSSON & HEIDEN (1982) desenvolveram carcinomas no palato de rato após 30-35 semanas, aplicando-se 4NQO por 12 ou 22 semanas. WONG & WILSON (1983) aplicaram 4NQO por 4, 8, 12, 16, 20 e 24 semanas, com desenvolvimento de carcinoma em 85% dos animais após 24 semanas. Em 1984, STEIDLER & READE verificaram que a incidência de carcinomas é proporcional ao período de aplicação do carcinógeno.

A susceptibilidade à ação dos agentes carcinogênicos químicos e ao 4NQO varia de acordo com a espécie e entre raças de ratos. KITANO et al. (1992) diluíram 4NQO a 0,001% na água de beber de sete raças de ratos até

apresentarem estado geral de caquexia. Todos desenvolveram carcinomas de boca e em outras partes do trato digestivo. Houve formação de múltiplos carcinomas na língua, gengiva inferior e superior, faringe e em algumas raças na faringe, laringe e traquéia. A raça Dark-Agouri apresentou menor sobrevida, 171,10; Sprague-Dawley 186,21 e os da raça Wistar-Furth tiveram maior sobrevida, 238,24 dias.

FISKER et al. (1990) mostraram a correlação entre a freqüência de aplicação do 4NQO e o grau de hiperplasia epitelial do palato de ratos.

#### 2.2.2.2- Lesões bucais causadas pelo 4NQO

A aplicação de 4NQO no palato, assim como o consumo na água de beber causa carcinomas no palato, língua e mandíbula. Antecedendo os carcinomas há formação de hiperplasias, hiperqueratose, leucoplasias, papilomas, displasia focal acantolítica (DFA), displasias e carcinoma "in situ" (SANTOS, 1999).

#### 2.2.2.2.3- Aspectos microscópicos das lesões causadas pelo 4NQO

A hiperplasia epitelial geralmente está associada à hiperqueratose. A camada córnea está mais espessa e a interface epitélio-conjuntivo mais longa e interdigitada. Nas regiões de hiperqueratose e displasia verificou-se por histoquímica um aumento de lipídios das células epiteliais, e nos carcinomas a diminuição (MATTHEWS et al., 1986).

RICH & READE (1988) descreveram, após 12-16 semanas, displasias semelhantes às que ocorrem em humanos, baseando-se nos critérios de SMITH & PINDBORG (1969), o que foi confirmado por NAUTA et al. (1995).

A displasia epitelial compreende alterações atípicas que começam na porção basilar e parabasilar do epitélio. Quanto mais displásico o epitélio se torna, mais as mudanças epiteliais atípicas se estendem para envolver toda a espessura do epitélio. (VAN DE WAAL, 1997)

As alterações histomorfológicas do epitélio displásico podem ser vistas como: cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, perda da polaridade das células basais (perda de maturação progressiva em direção à superfície), estratificação irregular do epitélio, queratinização de células individuais ou grupos de células na camada espinhosa e perda de coesão celular típica (SMITH & PINDBORG, 1969; VAN DER WAAL, 1997).

As alterações histopatológicas das células epiteliais displásicas incluem: núcleos e células maiores, nucléolos grandes e proeminentes, aumento da razão núcleo/citoplasma, núcleos hipercromáticos, pleomorfismo celular e nuclear disceratose (ceratinização prematura de células individuais), aumento da atividade mitótica, presença de mitoses atípicas (mitoses explosivas ou acima da camada basal). (SMITH & PINDBORG, 1969; VAN DER WAAL, 1997).

Quanto à gravidade ou intensidade, a displasia epitelial é classificada em:

- Displasia epitelial branda: refere-se às alterações limitadas principalmente às camadas basal e parabasal.

- Displasia epitelial moderada: demonstra o envolvimento desde a camada basal até a porção média da camada espinhosa.
- Displasia epitelial severa: apresenta alterações desde a camada basal até um nível acima da porção média do epitélio (VAN DER WAAL, 1997).

O Carcinoma “in situ” é definido como células epiteliais displásicas que se estendem da camada basal à superfície da mucosa (mudança “de cima para baixo”). O aspecto importante é que não existe invasão, apesar das células epiteliais atípicas parecerem exatamente igual às do carcinoma de células escamosas (VAN DER WAAL, 1997).

A disqueratose focal acantolítica (DFA) é uma alteração epitelial caracterizada pela presença de fendas suprabasais, contendo células acantolíticas e disqueratóticas eosinófilas (NAVARRO, 1992). Há associação com hiperqueratose, paraqueratose e hiperplasia da camada basal. De acordo com PRIME et al. (1986) há aumento do número de áreas de DFA no palato e na língua de ratos com o aumento de tempo em exposição ao 4NQO. Segundo NAVARRO et al. (1992) a sialoadenectomia favorece o desenvolvimento de DFA no palato e na língua de ratos. Considera-se que a DFA causada pelo 4NQO não evolui para carcinoma (NAVARRO, 1992).

O Carcinoma microinvasivo compreende um aspecto inicial da invasão da lâmina própria pelas células epiteliais atípicas, o qual pode ser considerado um intermediário entre o carcinoma “in situ” e o carcinoma espinocelular francamente invasivo (NAVARRO, 1992).

O carcinoma de células escamosas é caracterizado por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que apresentam diferenciação em direção a uma morfologia escamosa. As células geralmente apresentam abundância de citoplasma com núcleos grandes e um aumento da razão núcleo-citoplasma. São vistos variados graus de pleomorfismo celular e nuclear. O produto normal do epitélio escamoso é a queratina, e “pérolas de queratina” são produzidas por ilhas do epitélio escamoso, que amadurecem para formar um foco redondo e localizado de ceratina. Células isoladas também podem sofrer a ceratinização individual.

A graduação representa a avaliação histopatológica do grau em que estes tumores se parecem com seu tecido original (epitélio escamoso) e produzem seu produto normal (ceratina) (ANNEROTH et al., 1986).

As lesões são graduadas em uma escala de I a III. O grau histopatológico do tumor é relacionado ao seu comportamento biológico. Os tumores mais indiferenciados recebem os números mais altos (ANNEROTH et al., 1986). O carcinoma de células escamosas “grau I” ou “baixo grau” ou “bem diferenciado” é um tumor cujas células são muito parecidas com seu tecido de origem. O carcinoma de células escamosas “grau III” ou “alto grau” ou “pobremente diferenciado” ou “anaplásico” é um tumor com maior pleomorfismo celular e nuclear, com pouca ou nenhuma produção de queratina e difícil de ser identificado como originário do epitélio. O carcinoma com uma aparência microscópica entre estes dois extremos é rotulado como um carcinoma “grau II” ou “moderadamente diferenciado”. (ANNEROTH et al., 1986).

#### 2.2.2.2.4- Carcinogênese pelo 4NQO

A carcinogênese química experimental pode ser amplamente dividida em 2 estágios: iniciação e promoção (BERENBLUM & SHUBIK, 1947; BECKER, 1981). A iniciação resulta da exposição das células a uma quantidade apropriada de agente carcinogênico (iniciador) que causa lesão permanente do DNA. Por conseguinte é rápida e irreversível e as células se comportam como tumorais latentes (CAIRNS, 1981). A dose inicial de um carcinógeno completo é definida como a menor na qual não causa tumor. A dose iniciadora de 4NQO é considerada por FISKER et al. (1987) de 10 µl a 0,5% (255nmol), após 2,5 anos de observação, ou seja, uma dose maior provoca carcinoma. Entretanto, apenas a iniciação não é suficiente para a formação de tumor.

Os agentes promotores induzem tumores nas células previamente iniciadas porém não são tumorigênicos em si. As alterações celulares recorrentes da aplicação dos promotores são reversíveis e não causam dano permanente ao DNA (YING et al., 1982).

O 4NQO aplicado por longos períodos atua como iniciador e promotor da carcinogênese, já que o agente promotor pode ser o próprio carcinógeno aplicado continuamente ou qualquer irritante inespecífico (BERENBLUM & SHUBIK, 1947; BECKER, 1981).

# **Material e Métodos**

## 2.3- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1- ANIMAIS

No total, foram utilizadas 70 ratas (*Ratus norvegicus albinus*, Wistar), com peso inicial de aproximadamente 100 - 150g, alimentadas com água e ração. As ratas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos e submetidas a diversos tipos de tratamento como mostra a tabela 1.

**Tabela 1-** Distribuição do número total de ratas nos grupos controle, tratadas com CsA ou com NQO e tratadas com NQO+CsA.

Grupos (n)	Controle	CsA	NQO	NQO+CsA
70	12	14	11	33

As ratas que morreram antes do período estipulado para o encerramento do experimento (240 dias) foram sendo substituídas por novas ratas, as quais completaram o experimento. Durante todo o período experimental as ratas foram pesadas semanalmente.

### 2.3.2- CICLOSPORINA A (CSA)

A Ciclosporina A\* armazenada em ampolas na concentração de 50mg/ml, foi diluída em solução autoclavada de NaCl (0,9%) na concentração final

---

\* Sandimmun (Novartis)

de 10 mg/ml. A solução de CsA foi administrada nos animais dos grupos CsA e NQO+ CsA, na concentração de 10mg/Kg de peso corporal/dia, por via subcutânea (WASSEF et al., 1985) durante todo período do experimento.

### **2.3.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (NQO)**

O Óxido de Nitroquinolina (NQO)\* diluído a 0,5% em propilenoglicol foi pincelado no palato dos ratos, não anestesiados, com auxílio de uma pinça anatômica e pincel nº 04, três vezes por semana, em dias alternados, após 8 dias do início da administração da CsA. A aplicação foi feita com único movimento, da região posterior para a anterior do palato. Estima-se que a quantidade do carcinógeno aplicado seja de 14 µg ( FISKER et al., 1990). Após cada aplicação do carcinógeno, os ratos eram privados de água por 2 horas.

O procedimento de aplicação requer pelo menos duas pessoas de tal forma que uma segura o animal, sendo que ele não será anestesiado, e a outra abre sua boca e pincela a droga. Ambos os procedimentos devem ser feitos cuidadosamente, de forma a não machucar o animal. Foram adotados procedimentos adicionais de controle de contaminação visto que a droga é carcinógeno potente. As bancadas utilizadas eram sempre cuidadosamente forradas e o papel descartado em lixo hospitalar contaminado.

---

\* 4-nitroquinoline-1-óxido (Sigma)

Após 240 dias (08 meses) do início do experimento, período que se verificava o aparecimento de lesões intrabucais, os animais foram mortos com injeção letal de anestésico<sup>\*</sup>. Foram retirados língua, maxila, mandíbula e as peças foram fixadas em formol tamponado (pH 7,4) a 10%. Os animais que foram a óbito antes do período estipulado de 240 dias não foram utilizados neste experimento.

### 2.3.4- OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

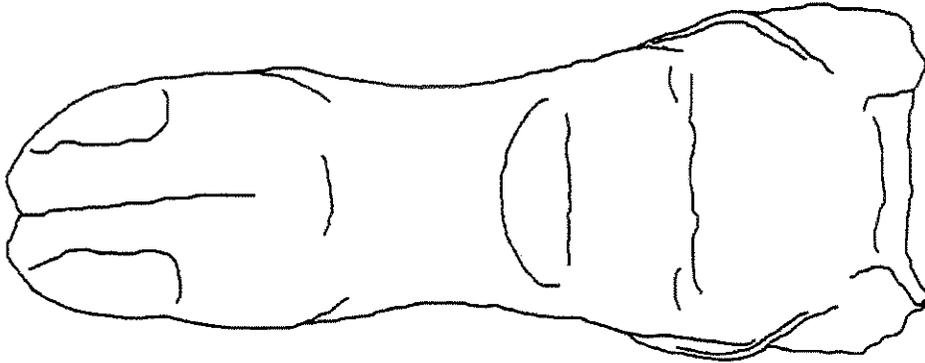
As peças retiradas das ratas foram avaliadas e foi realizada a descrição macroscópica das lesões e anormalidades observadas no palato e língua seguindo alguns critérios listados no quadro 1.

**Quadro 1- Critérios de avaliação macroscópica das lesões presentes na língua e palato das ratas**

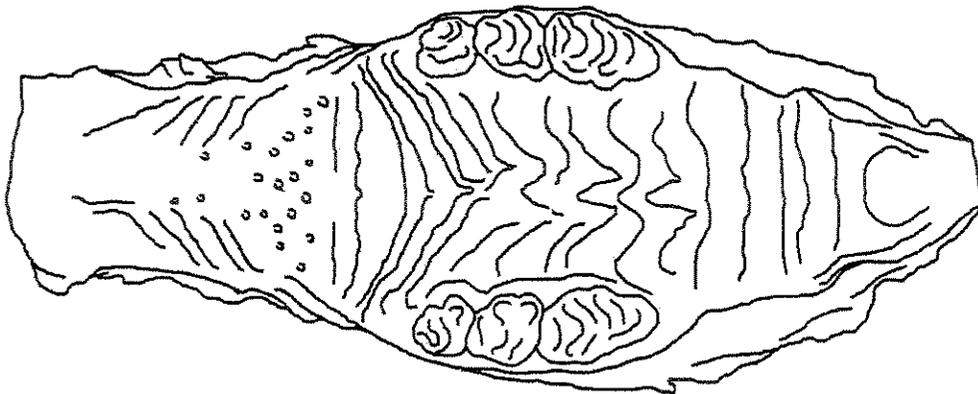
<b>Língua</b>
1- Presença de mucosa esbranquiçada 2- Alteração nas papilas linguais 3- Aspecto papilomatoso 4- Presença de úlceras
<b>Palato</b>
1- Presença de mucosa esbranquiçada 2- Perda da definição das rugosidades palatinas 3- Aspecto papilomatoso 4- Presença de úlceras

As observações macroscópicas descritas foram transferidas para um esquema da língua (FIG 1) e do palato (FIG 2) para melhor quantificar e qualificar as lesões.

<sup>\*</sup> Francotar/Vyrbaxyl – quetamina/cloridrato de xilazina (Virbac)



**Figura 1-** Esquema da língua de rato utilizado para a descrição macroscópica das lesões bucais provocadas pelo NQO



**Figura 2-** Esquema do palato de rato utilizado para a descrição macroscópica das lesões bucais provocadas pelo NQO

Foram realizadas fotografias dos aspectos macroscópicos de todas as peças afim da documentação dos aspectos clínicos das lesões.

### 2.3.5- OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

Após a avaliação macroscópica, as peças foram cuidadosamente reduzidas respeitando a localização das lesões e seus fragmentos foram processados para a inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 4 µm, os quais foram colocados em lâminas silanizadas. Os cortes foram corados pela técnica de H/E para avaliação histomorfológica..

A análise descritiva dos padrões morfológicos da língua e do palato foi realizada em microscopia de luz transmitida comumente. De acordo com os achados histológicos, as lesões foram classificadas segundo os critérios utilizados na Quadro 2. Estes foram associados às manifestações clínicas encontradas.

**Quadro 2.** Critérios de classificação microscópica das alterações presentes na língua e palato das ratas dos grupos controle, tratadas com CsA ou NQO e tratadas com CsA+NQO.

<b>Língua</b>
1- hiperqueratose e acantose (compatível com leucoplasia)
2- displasia leve
3- displasia moderada
4- displasia severa
5- carcinoma microinvasivo
6- carcinoma espino celular grau I (bem diferenciado)
7- carcinoma espino celular grau II (moderadamente diferenciado)
8- carcinoma espino celular grau III (pouco diferenciado)
<b>Palato</b>
1- hiperqueratose e acantose (compatível com leucoplasia)
2- displasia leve
3- displasia moderada
4- displasia severa
5- carcinoma microinvasivo
6- carcinoma espino celular grau I (bem diferenciado)
7- carcinoma espino celular grau II (moderadamente diferenciado)
8- carcinoma espino celular grau III (pouco diferenciado)

### **2.3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos dados foi realizada afim de contribuir com a interpretação dos resultados observados.

Para avaliar a proporção de animais por grupo foi utilizado um teste Qui-quadrado. Para avaliar o período de sobrevivência dos animais e o ganho de peso corporal foram utilizados análise de variância e teste para comparações múltiplas de médias de Tukey, afim de verificar quais das médias dos grupos diferiram entre si. Foi adotado um nível de significância de 5%.

As variáveis da análise macroscópica e análise microscópica observadas são dados de natureza nominal. Portanto, optou-se pela aplicação de estatísticas não-paramétricas. Foram selecionados os testes de Kruskal-Wallis, para comparação de todas as médias entre si, e quando foram detectados efeitos significativos por este teste, realizou-se o teste de Wilcoxon, para comparação das médias duas a duas. Foi adotado um nível de significância de 5%.

# *Resultados*

## 2.4- RESULTADOS

### 2.4.1- RATAS

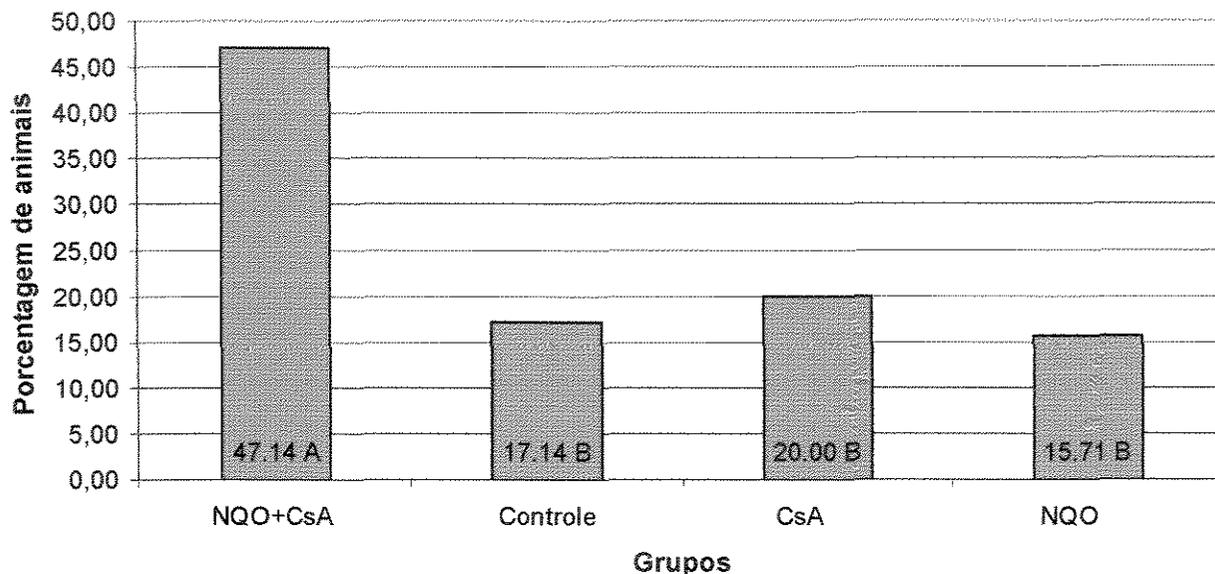
Do total de ratas utilizadas 28 morreram antes do período de 240 dias (período final), as quais foram substituídas por outras de modo que completasse o número de animais previsto para o grupo. As que morreram antes de 240 dias não foram utilizadas para a discussão dos resultados.

A tabela 2 e FIG 3 mostram o número de ratas utilizadas no trabalho e que morreram antes do final do experimento e as ratas que foram sacrificadas com 240 dias, e utilizadas para a discussão dos resultados.

**Tabela 2.** Animais pertencentes aos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA que morreram antes de 240 ou que foram sacrificados aos 240 dias .

Grupos	Controle	CsA	4NQO	4NQO+CsA
Ratas mortas antes de 240 dias	0	4	5	19
Ratas sacrificadas com 240 dias	12	10	6	14
Total de animais	12	14	11	33
%	17,14 B	20,0 B	15,71 B	47,14 A

\* Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado com nível de significância de 5% (p<0.05)



**Figura 3.** Gráfico da porcentagem de animais pertencentes aos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA.

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

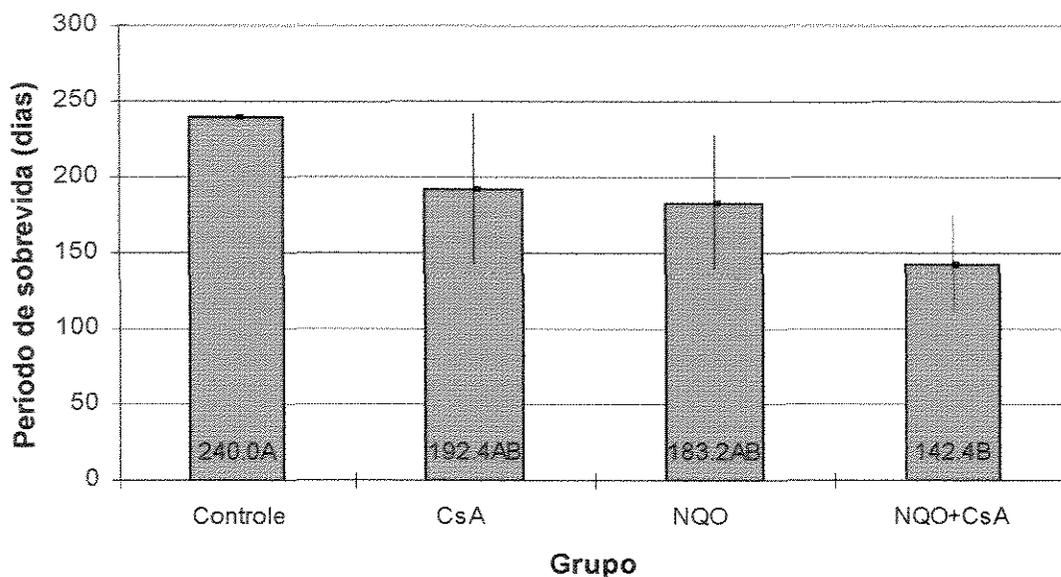
#### 2.4.1.1- Período de sobrevida

A Tabela 3 e FIG 4 mostram que o tratamento com CsA associado com 4NQO, diminuiu significativamente a sobrevida das ratas. Quando os tratamentos foram administrados separadamente a sobrevida foi semelhante.

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão do Período de sobrevida (em dias) dos animais dos grupos Controle, tratados com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA.

Grupo	n	Média	Letra
Controle	12	240.00 ± 0	A
CsA	14	192.42 ± 87.08	AB
4NQO	11	183.18 ± 65.30	AB
4NQO+CsA	33	142.42 ± 91.66	B

\* Médias com letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )



**Figura 4.** Gráfico do período de sobrevivência (em dias) dos animais pertencentes aos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA

\* Médias com letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

#### 2.4.1.2- Peso corporal

A tabela 4 apresenta as médias do ganho de peso corporal das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com associação de 4NQO e CsA.

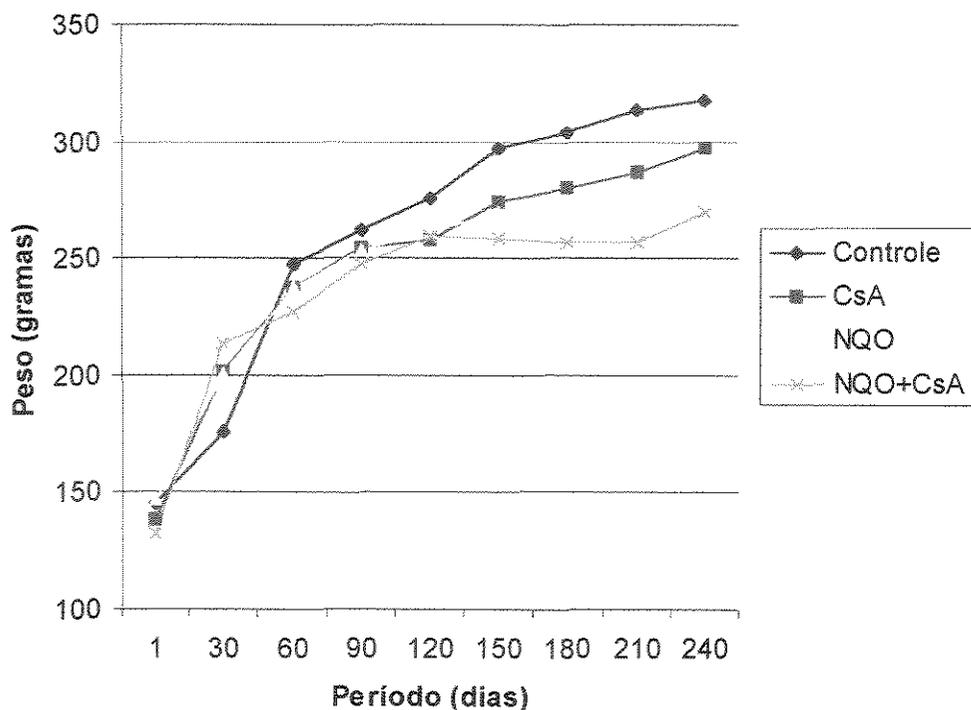
**Tabela 4.** Médias e desvio padrão do ganho de peso corporal das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA.

Grupo	n	Média	Letras de Significância
Controle	12	160.83 ± 27.45	A
CsA	14	160.00 ± 36.51	A
4NQO	11	133.33 ± 20.65	A
4NQO+CsA	33	126.42 ± 46.01	A

\* Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

A FIG 5 ilustra a média dos pesos (em gramas) das ratas durante todo o período experimental (em dias).

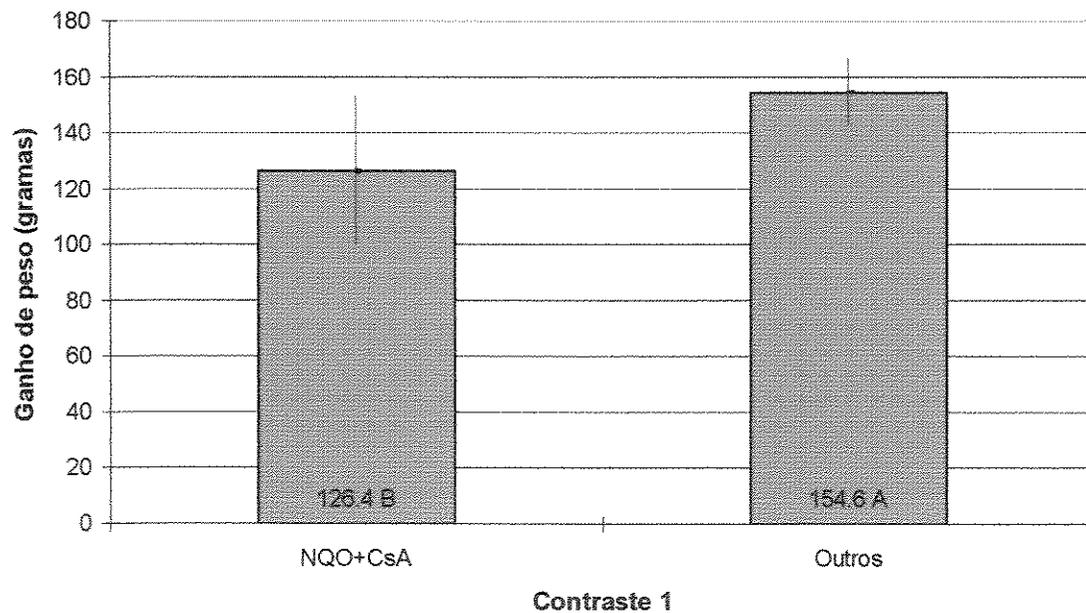
Observa-se que os pesos corporais das ratas permaneceram semelhantes até o período de 60 dias, independente do tratamento recebido. A partir desse período, as ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA tiveram ganho de pesos menores em relação aos outros grupos. Ainda pode ser notado que as ratas tratadas somente com CsA ou 4NQO tiveram médias de peso menores do que as do grupo controle, consecutivamente.



**Figura 5.** Gráfico da média de peso corporal (g) das ratas pertencentes aos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA, durante o período do experimento

Na análise de variância para o estudo do ganho de peso dos animais encontrou-se um valor- $p < 0.05$  indicando diferença entre as médias dos grupos. Entretanto, o teste de Tukey falhou em detectar indícios de diferenças entre as médias de ganho de peso dos grupos.

Desta forma, foram construídos um conjunto de contrastes ortogonais (1 e 2) para testar hipóteses personalizadas. O contraste 1 comparou a média de ganho de peso corporal das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA com a média dos demais grupos.

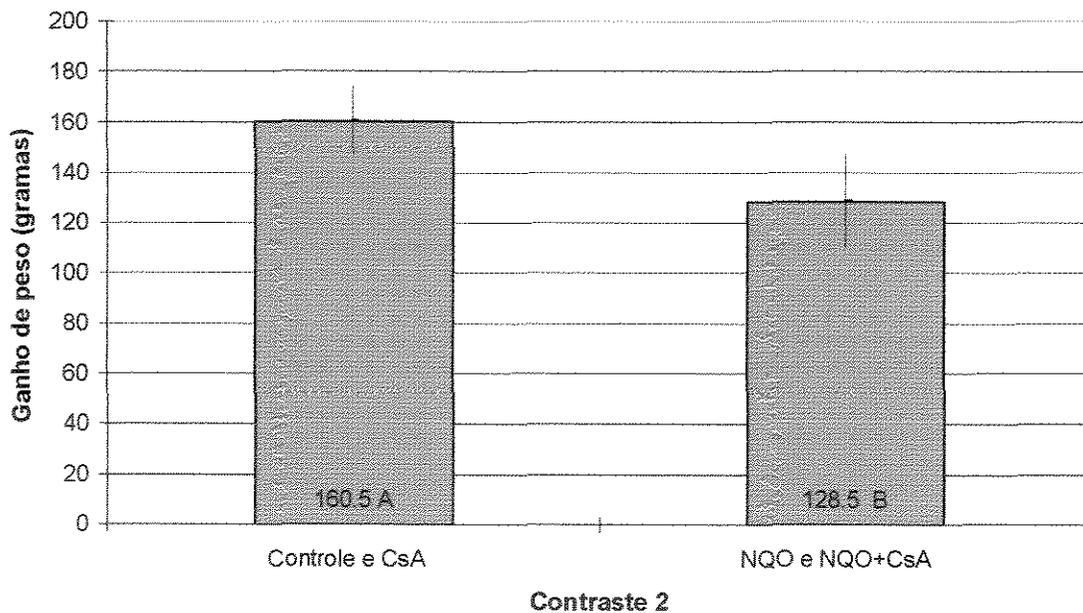


**Figura 6.** Gráfico do contraste entre as médias de ganho de peso (em gramas) dos animais do grupo 4NQO+CsA vs outros grupos.

\* Médias com letras iguais não diferem entre si através do teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

Através do contraste 1 observou-se que a média de ganho de peso dos animais do grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente inferior à média de ganho de peso dos demais grupos, conforme os dados da tabela 4 e da ilustração da FIG 6.

No contraste 2, comparou-se a média de ganho de peso dos animais tratados com 4NQO, seja no grupo 4NQO ou no grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA, com a média dos grupos que não foram tratados com 4NQO, ou seja, Controle e ratas tratadas somente com CsA.



**Figura 7.** Gráfico do contraste entre de Ganho de peso dos animais (em gramas) dos grupos que receberam e que não receberam tratamento com 4NQO.

Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

Foi possível detectar que a média de ganho de peso dos animais do grupo controle e que receberam o tratamento somente com CsA foi significativamente superior à média das animais tratadas somente com 4NQO e tratadas com a associação de 4NQO e CsA, através da análise do contraste 2 conforme ilustrado na FIG 7.

O conjunto de contrastes ortogonais foi finalizado com a comparação entre os grupos de animais que receberam o tratamento 4NQO e o tratamento com a associação de 4NQO e CsA, o qual revelou a inexistência de indícios de diferenças entre as médias dos dois grupos.

## 2.4.2- ANÁLISE MACROSCÓPICA

### 2.4.2.1- Língua

As línguas das ratas do grupo Controle e as das ratas tratadas somente com CsA não tiveram alterações, após 240 dias de tratamento (FIG 12).

Estas línguas que não receberam tratamento com 4NQO apresentaram a superfície dorsal recoberta pela membrana mucosa íntegra, contendo as papilas linguais características sem alterações. A porção dorsal da língua era separada em porção anterior (bucal) e posterior (faríngea) pelo sulco terminal em V, composto pelas papilas circunvaladas, entretanto esta separação nem sempre era visível macroscopicamente.

O tratamento com 4NQO aumentou significativamente ( $p < 0.05$ ) as alterações linguais. Com a associação dos tratamentos 4NQO e CsA, o número de alterações linguais foi maior quando comparado aos demais grupos (tabela 5). Estes dados serão abordados separadamente.

**Tabela 5.** Número de alterações macroscópicas presentes na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA, expressas em porcentagem.

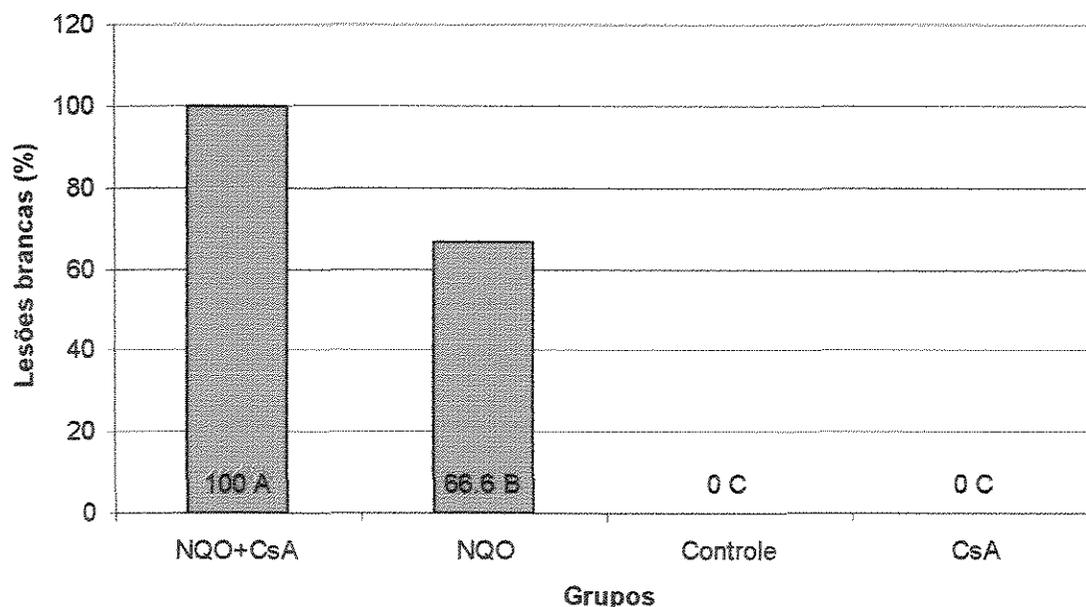
Grupo	Presença de lesão branca		Alteração das papilas linguais		Lesão Exofítica		Presença de úlceras	
4NQO + CsA	100	A	100	A	42,85	A	71,42	A
4NQO	66,66	B	66,66	B	0	AB	66,66	A
Controle	0	C	0	C	0	B	0	B
CsA	0	C	0	C	0	B	0	B

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

### 2.4.2.1.1- Presença de lesões brancas - língua

As lesões brancas apareceram como regiões irregulares com superfície esbranquiçada e levemente opaca, com tamanhos variáveis, aparecendo localizadas ou em várias regiões (FIG 13 a 20).

A porcentagem de lesões brancas presentes na língua do grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior às de todos os demais grupos. Também observou-se que a porcentagem destas lesões presentes no grupo 4NQO foi superior à dos grupos Controle e CsA, cujos valores não diferiram entre si. A comparação das porcentagens de lesões brancas são ilustradas na FIG 8.



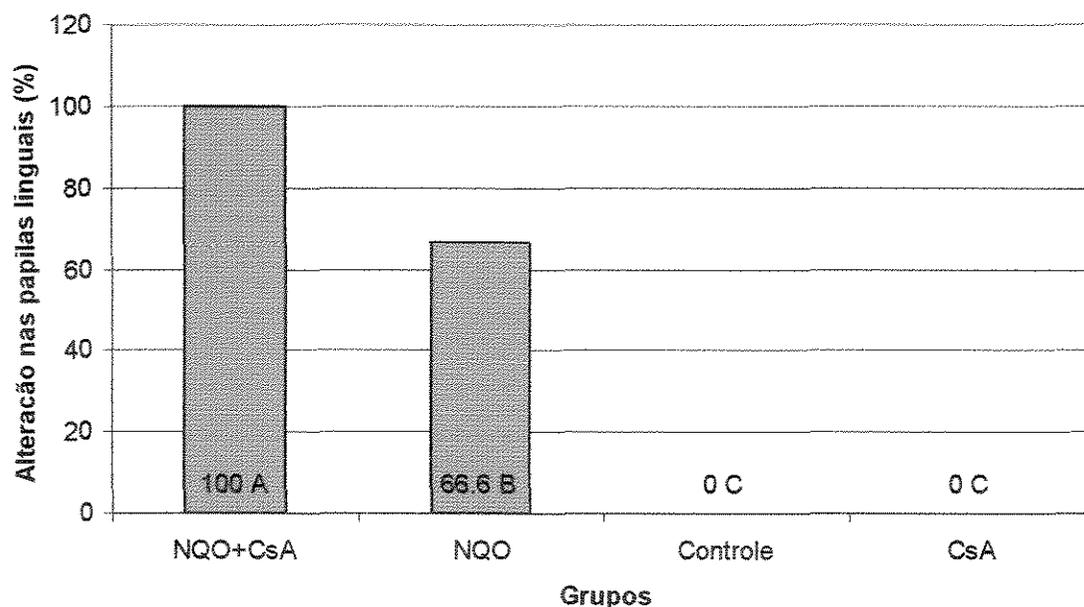
**Figura 8.** Gráfico da porcentagem de lesões brancas, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA.

\* Médias com letras iguais não diferem entre si através do teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

### 2.4.2.1.2- Alterações das papilas linguais

A superfície dorsal das línguas apresentavam aspecto irregular, devido à presença de atrofia ou hipertrofia das papilas linguais. As áreas de atrofia consistiam de regiões onde a superfície dorsal da língua apresentava-se lisa e brilhante. Nas regiões de hipertrofia as papilas linguais apresentavam-se maiores, dando um aspecto de língua "pilosa" (FIG 13 a 20).

A porcentagem de alterações das papilas linguais do grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior às dos demais grupos. Além disso, a porcentagem presente no grupo 4NQO foi significativamente superior à dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 9).



**Figura 9.** Gráfico porcentagem de alteração nas papilas linguais, presente nas ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA.

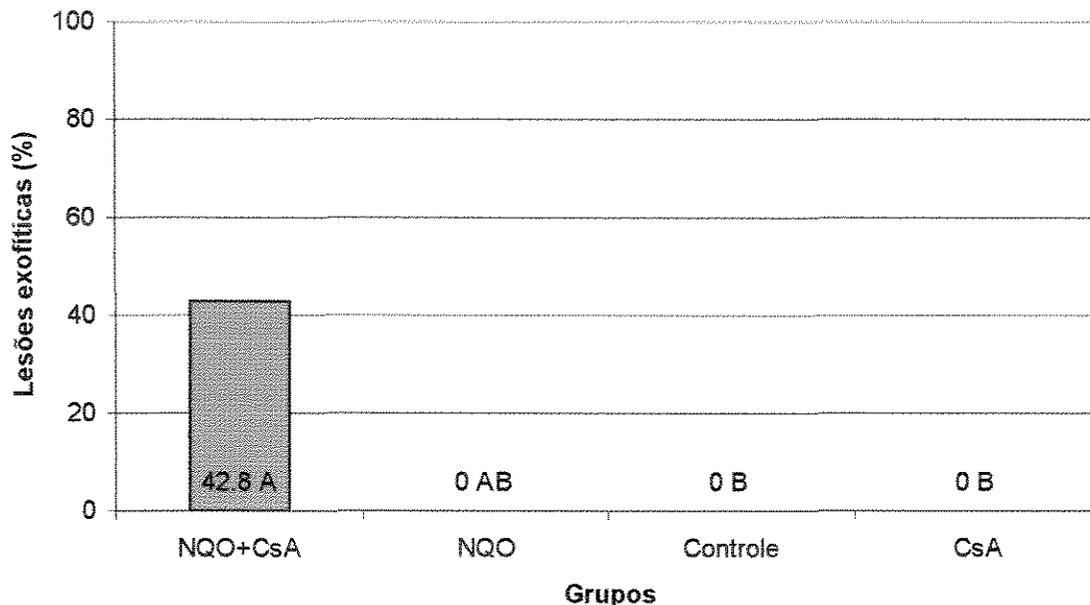
\* Médias com letras iguais não diferem entre si através do teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

#### 2.4.2.1.3- Presença de lesões exofíticas- língua

As lesões exofíticas consistiam em crescimentos papilomatosos, exofíticos, em dedos de luva, com tamanhos e localizações variáveis (FIG 15 a 19).

Observou-se que a porcentagem de lesões exofíticas presente na língua das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior às das ratas dos grupos Controle e CsA. Embora a porcentagem de lesões exofíticas presentes na língua da ratas tratadas com a associação das drogas tenha sido maior do que a das ratas tratadas somente com 4NQO (n=0), não houve indícios estatísticos que permitam afirmar que os grupos difiram significativamente entre si.

Entretanto, observou-se que a porcentagem dos grupos 4NQO, CsA e Controle são iguais (0). Pode-se afirmar então, que houve diferença entre os grupos tratadas com 4NQO e tratadas com a associação de 4NQO e CsA, porém não detectado pelo teste estatístico. A porcentagem de lesões exofíticas do grupo de ratas tratadas com 4NQO não diferiu significativamente da dos grupos Controle e CsA (FIG 10).



**Figura 10.** Gráfico da porcentagem de lesões exofíticas, presente nas línguas das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA.

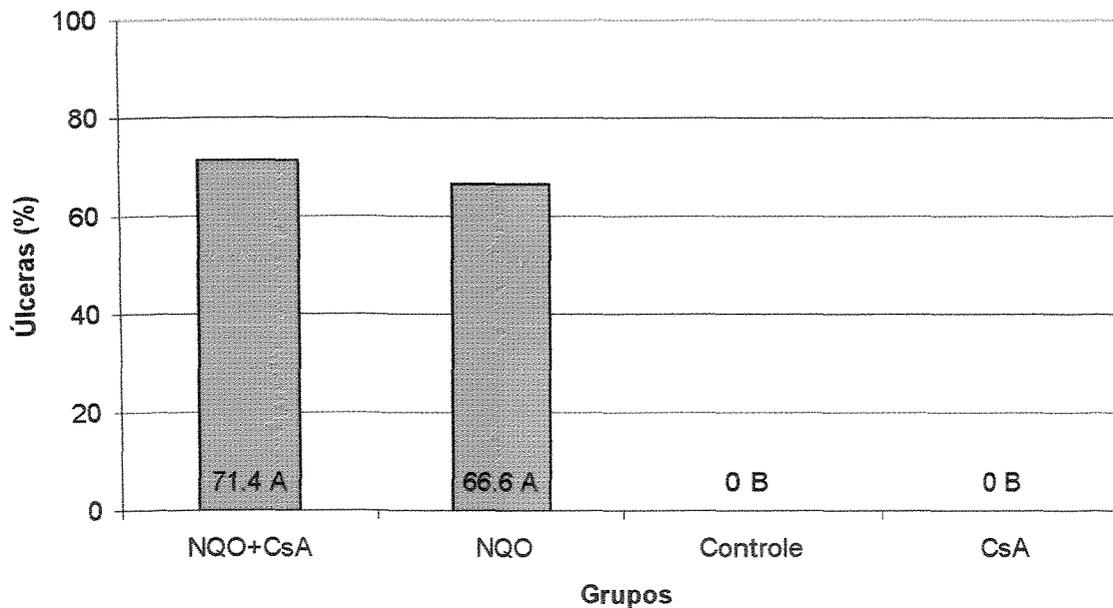
\* Médias com letras iguais não diferem entre si através do teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

#### 2.4.2.1.3- Presença de úlceras- língua

As úlceras presentes na língua variavam em tamanho, podendo ser pequenas ou ulcerações deformantes. Estas geralmente eram arredondadas e continham material amorfo que variava de coloração esbranquiçada a acastanhada (FIG 13, 14 e 17 a 20).

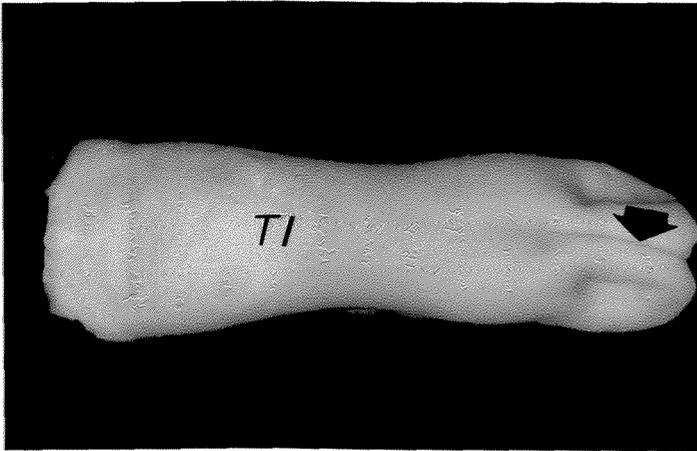
Observou-se na FIG 11 que a porcentagem de lesões ulcerativas presentes na língua das ratas tratadas com 4NQO e tratadas com 4NQO e CsA foram semelhantes. Porém, ambas foram significativamente maiores do que as

dos grupos de ratas Controle e tratadas somente com CsA, que também não diferiram entre si.

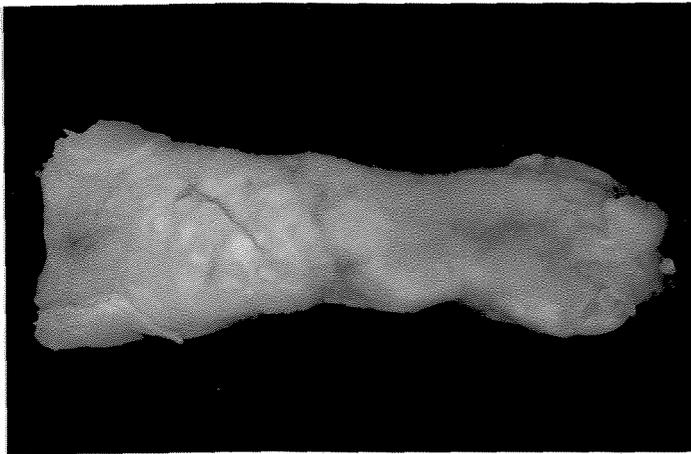


**Figura 11.** Gráfico da porcentagem de úlceras, presente nas línguas das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Médias com letras iguais não diferem entre si através do teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )



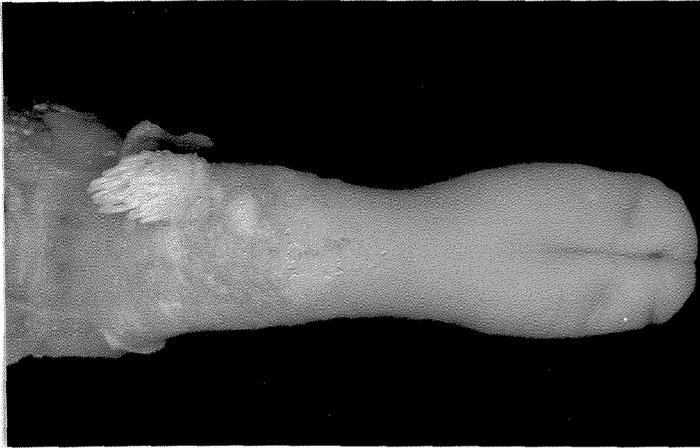
**Figura 12-** Aspecto macroscópico da língua de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos. Observa-se o aspecto de normalidade. A região anterior apresenta o "sulco" lingual (seta) e a posterior o tubérculo intermolar (TI).



**Figura 13-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com 4NQO, apresentando mucosa esbranquiçada, atrofia de papilas e úlcera.



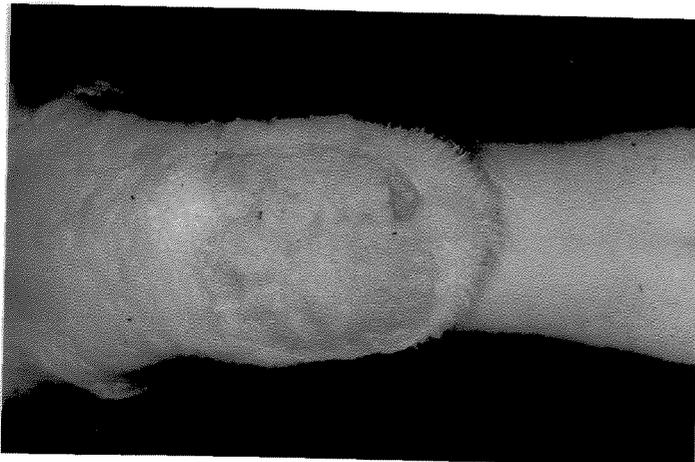
**Figura 14-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com 4NQO, apresentando úlcera na região de tubérculo intermolar. Há presença de mucosa esbranquiçada e atrofia de papilas.



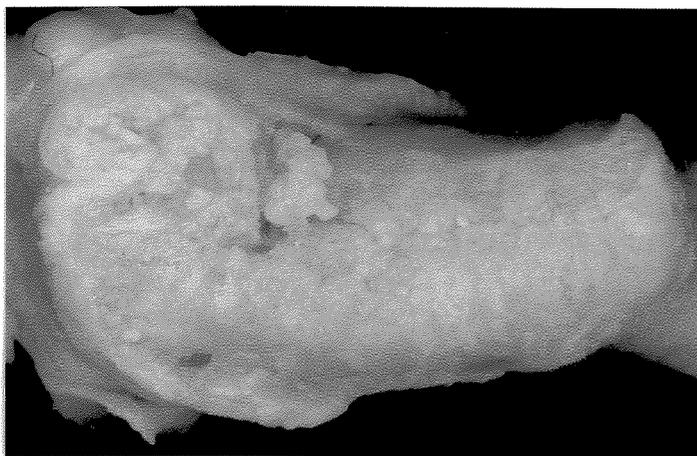
**Figura 15-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com 4NQO e CsA apresentando papiloma de aspecto verrucoso. Há alteração nas papilas linguais e lesões esbranquiçadas espalhadas pelo dorso da língua



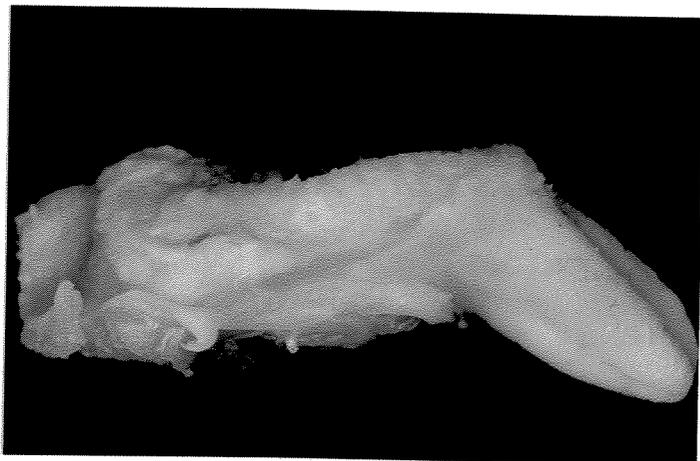
**Figura 16-** Vista lateral da figura anterior mostrando o papiloma e evidenciando as lesões esbranquiçadas e as alterações das papilas linguais.



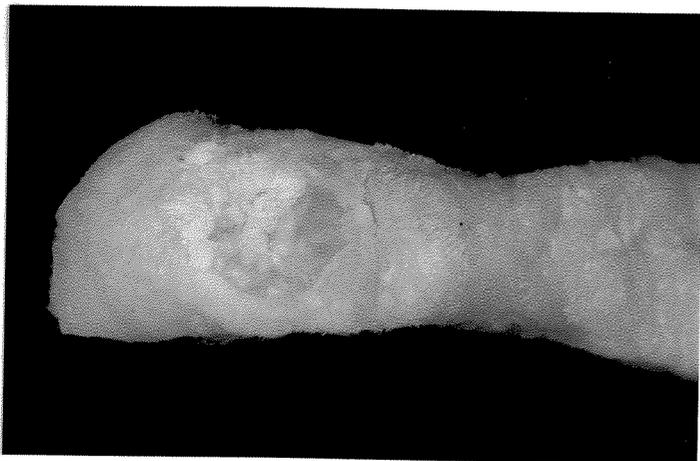
**Figura 17-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com a associação de 4NQO e CsA apresentando lesão exofítica e lesão ulcerada, além de presença de mucosa esbranquiçada e alteração das papilas linguais.



**Figura 18-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando lesão exofítica com úlcera deformante, envolvendo toda a região posterior da língua, além de mucosa esbranquiçada e alteração das papilas linguais.



**Figura 19-** Vista lateral da figura anterior evidenciando que a associação de 4NQO e CsA causa lesões mais agressivas, causando até deformações.



**Figura 20-** Aspecto macroscópico da língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando úlcera na região de tubérculo intermolar. Há presença de mucosa esbranquiçada e hipertrofia de papilas.

### 2.4.2.2- Palato

Os palatos das ratas do grupo Controle e as das ratas tratadas com CsA não tiveram alterações, após 240 dias de tratamento (FIG 25).

Estes palatos que não receberam tratamento com 4NQO, apresentavam rugosidades palatinas lisas na região antemolar e três rugosidades em forma de M e duas em forma de V na região intermolar. Na região posterior aos molares observa-se uma linha esbranquiçada denominada de ponte transversa (PT) a qual separa o palato duro do palato mole.

O tratamento com 4NQO aumentou significativamente ( $p < 0.05$ ) as alterações palatinas. Com a associação do tratamento com 4NQO e CsA, o número de alterações foi maior quando comparado aos demais grupos (tabela 6).

**Tabela 6.** Número de alterações macroscópicas presentes no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA, expressas em porcentagem.

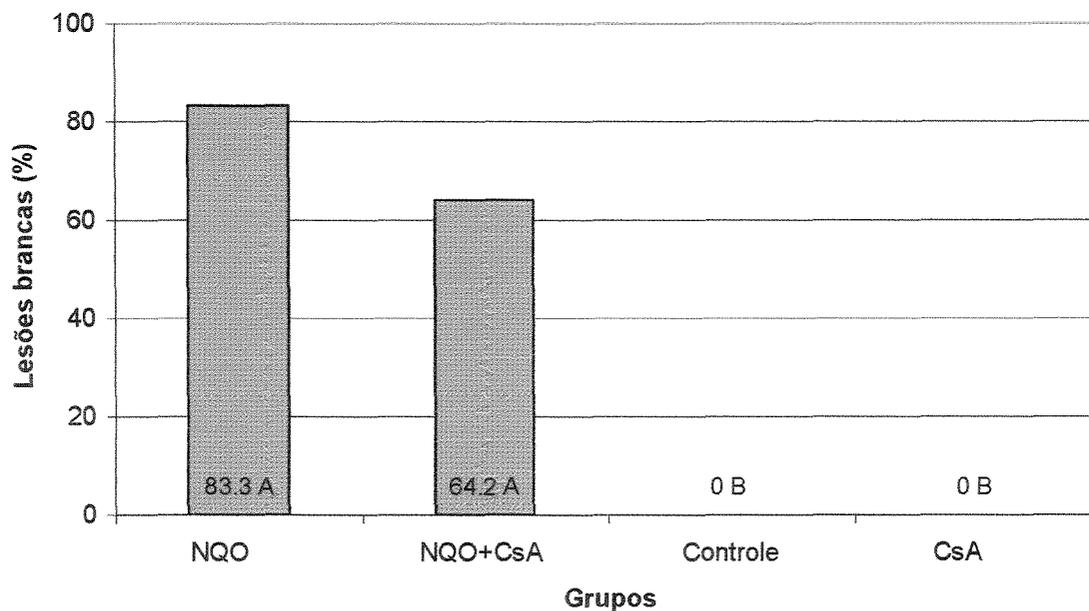
Grupo	Presença lesão branca	Perda de definição das rugosidades palatinas	Lesão Exofítica	Presença de Úlceras
4NQO + CsA	64,28 A	100 A	64,28 A	71,42 A
4NQO	83,33 A	83,33 A	33,33 A B	66,66 A
Controle	0 B	0 B	0 B	0 B
CsA	0 B	0 B	0 B	0 B

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

Também foi observada a presença de aumento gengival nas ratas tratadas com CsA, já bem estabelecido na literatura, mas não relevante para este trabalho.

#### 2.4.2.2.1- Palato – Presença de Lesões brancas

As lesões brancas apareceram como regiões irregulares com superfície esbranquiçadas e levemente opacas, com tamanhos variáveis, aparecendo localizadas ou em várias regiões (FIG 26 a 30). Observou-se que a porcentagem de lesões brancas no palato das ratas tratadas somente com 4NQO foi superior à das ratas tratadas com a associação 4NQO e CsA, mas não estatisticamente significante. Verificou-se que as porcentagens de ambos diferem significativamente das dos grupos Controle e CsA. Estes, por sua vez, não diferem entre si (FIG 21).



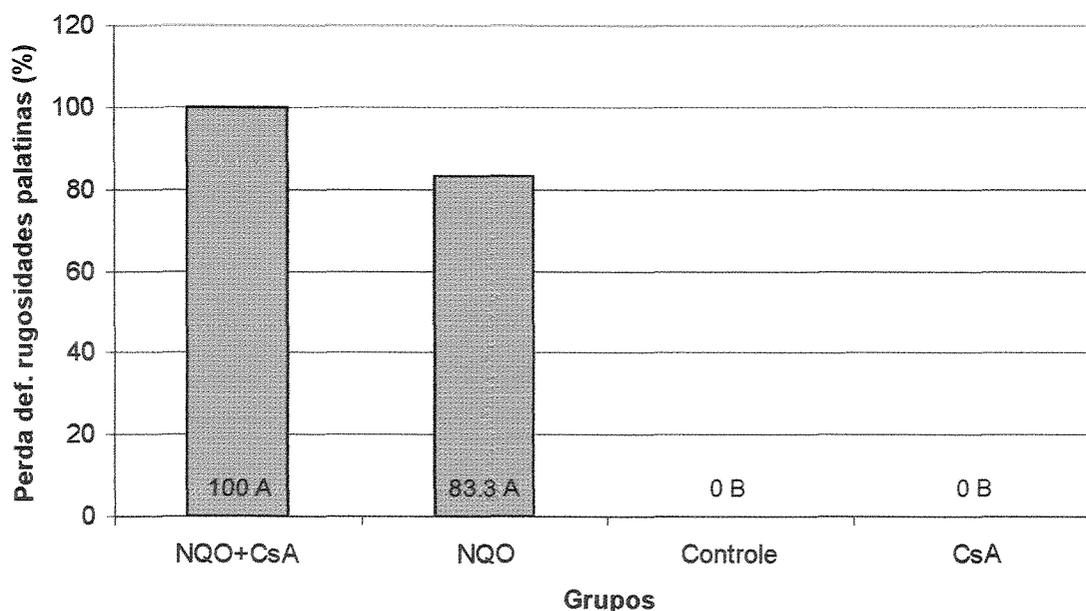
**Figura 21.** Gráfico da porcentagem de lesões brancas, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

#### 2.4.2.2.2- Perda de definição das rugosidades palatinas

A principal alteração palatina presente era o aplainamento das rugosidades palatinas presente no palato de ratas normais, principalmente na região intermolar (FIG 26 a 30).

Foi observado que as ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA apresentaram porcentagem de perda de definição das rugosidades palatinas maior do que as do grupo tratadas com 4NQO, porém não estatisticamente significante. Notou-se que as porcentagens dos grupos tratadas com a associação de 4NQO e CsA e tratadas com 4NQO foram significativamente superiores às dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 22).



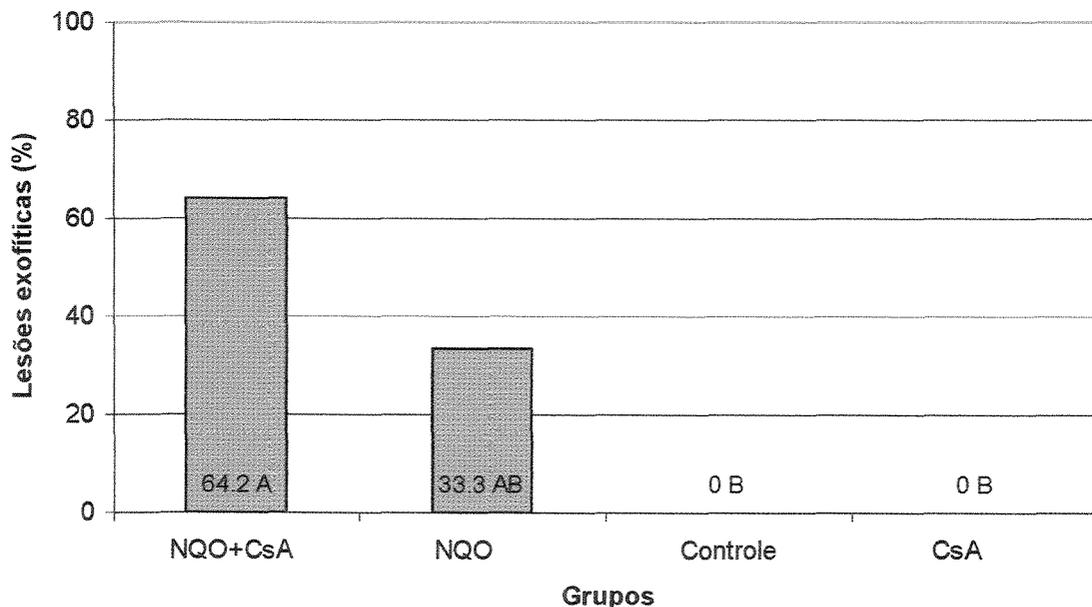
**Figura 22.** Gráfico da porcentagem de perda da definição das rugosidades palatinas, presente nas ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

### 2.4.2.2.3- Palato – Presença de Lesões exofíticas

As lesões exofíticas palatinas consistiam em crescimentos papilomatosos, exofíticos, em dedos de luva, com localizações e tamanhos variáveis (FIG 28 a 30).

Observou-se que a porcentagem de lesões exofíticas do grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior às dos grupos Controle e CsA. Embora a porcentagem do grupo da associação das drogas tenha sido bem maior do que a do grupo tratadas com 4NQO, não houve diferença estatística entre ambos. Também não houve diferença estatística entre a porcentagem do grupo tratadas com 4NQO e dos grupos Controle e CsA (FIG 23).



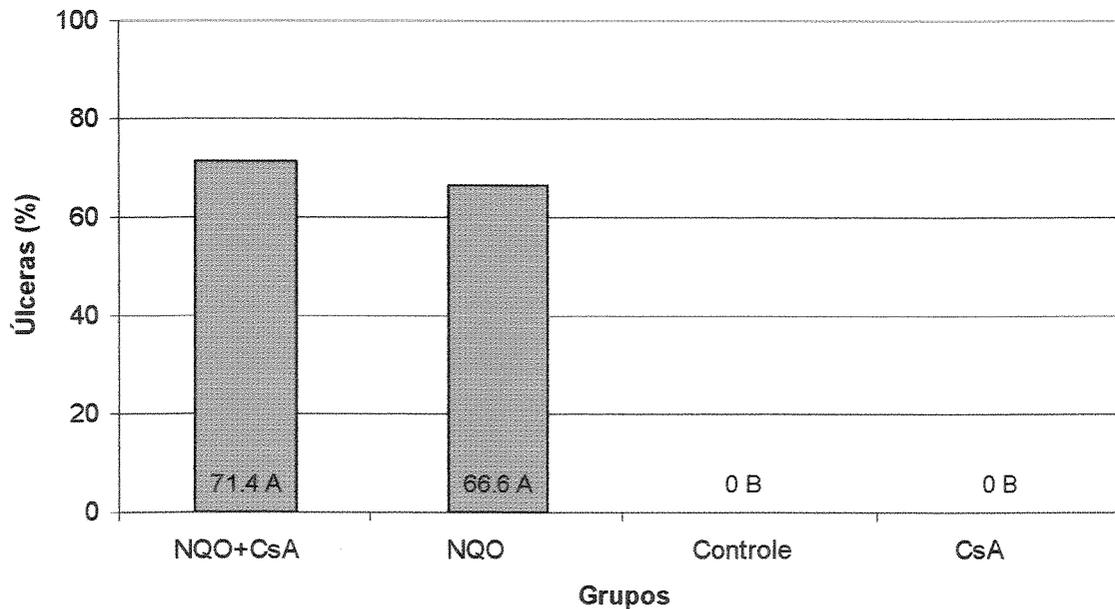
**Figura 23.** Gráfico da porcentagem de lesões exofíticas, presentes no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

#### 2.4.2.2.4- Palato – Presença de úlceras

As úlceras presentes no palato variavam em tamanho, podendo ser pequenas ou ulcerações deformantes. Estas geralmente localizavam-se na região intermolar podendo conter material amorfo de coloração variando de esbranquiçada a acastanhada (FIG 27 e 30).

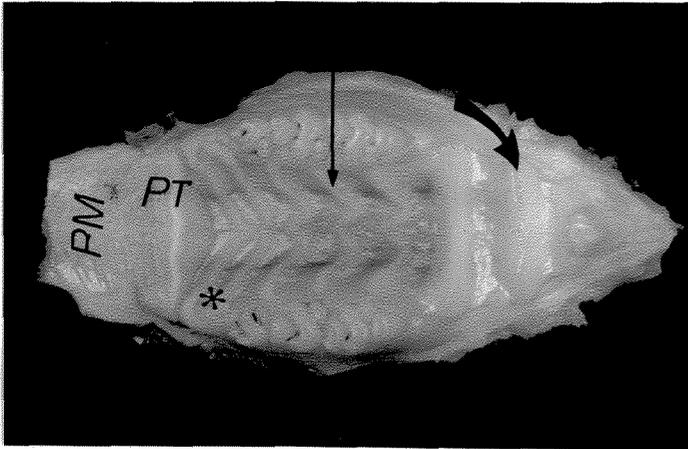
Observou-se que a porcentagem de úlceras presente nas ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA e tratadas somente com 4NQO não diferiram significativamente entre si. Porém, ambas diferem do segundo grupo formado por ratas Controle e tratadas com CsA, que também não diferem entre si (FIG 24).



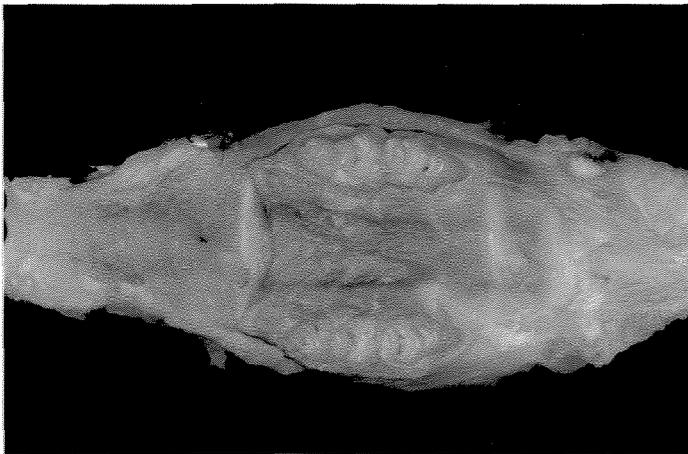
**Figura 24.** Gráfico das médias de postos (em escores) da variável presença de presença de úlceras, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

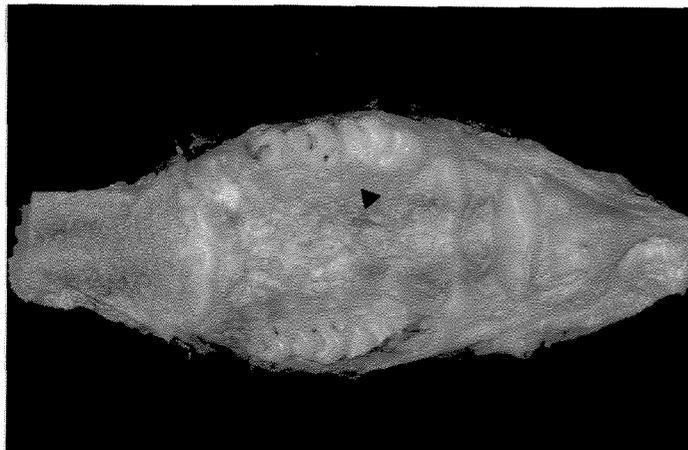
**Figura 25-** Aspecto macroscópico do palato de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos, mostrando as rugosidades palatinas lisas na região antemolar (seta larga), 3 rugosidades em forma de M (seta estreita) e 2 em forma de V ( \* ) na região intermolar. Na região posterior aos molares observa-se uma linha esbranquiçada denominada ponte transversa (PT) que separa o palato duro do palato mole (PM).

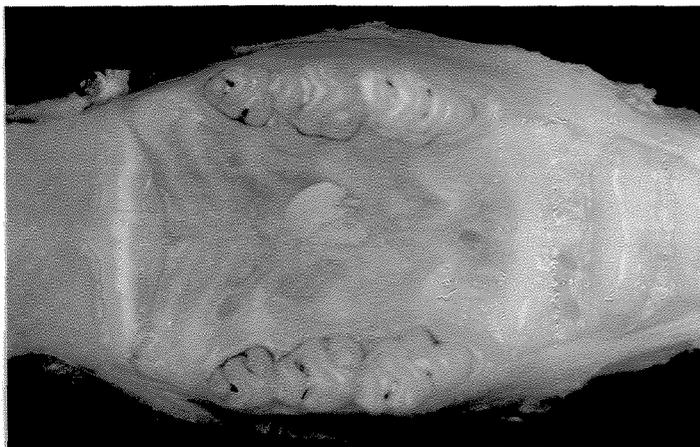


**Figura 26-** Aspecto macroscópico do palato de rata tratada com 4NQO apresentando mucosa esbranquiçada e perda de definição das rugosidades palatinas.

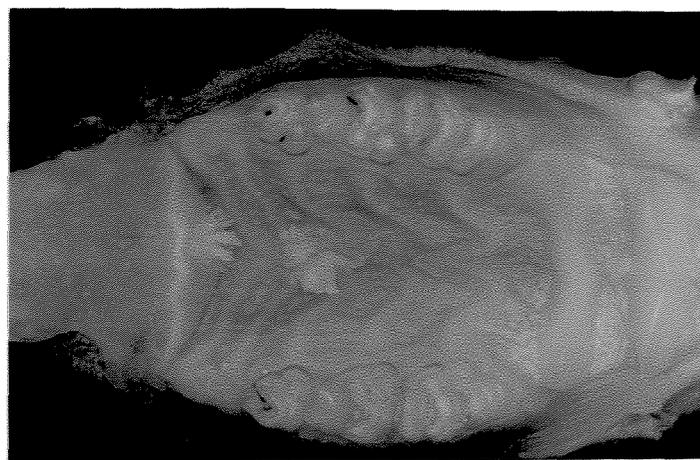


**Figura 27-** Aspecto macroscópico do palato de rata tratada com 4NQO apresentando mucosa esbranquiçada generalizada e perda de definição das rugosidades palatinas. Há presença de uma pequena ulceração na região intermolar (seta).

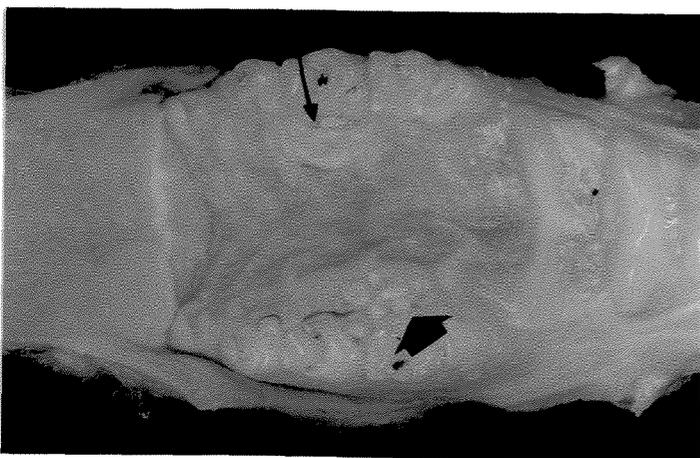




**Figura 28-** Aspecto macroscópico do palato de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando lesão exofítica presente na região intermolar, além de presença de mucosa esbranquiçada e perda de definição das rugosidades palatinas.



**Figura 29-** Aspecto macroscópico do palato de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando lesões exofíticas na região intermolar e na região de transição palato/palato mole, além de perda de definição das rugosidades palatinas e mucosa esbranquiçada.



**Figura 30-** Aspecto macroscópico do palato de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando perda de definição das rugosidades palatinas, mucosa esbranquiçada e lesão papilomatosa envolvendo os molares esquerdos (seta larga) e úlcera envolvendo os molares direitos ( seta estreita).

## **2.4.3- ASPECTOS MICROSCÓPICOS**

### **2.4.3.1- Língua**

As línguas das ratas do grupo Controle e as das ratas tratadas com CsA não tiveram alterações, após 240 dias de tratamento.

Estas línguas que não foram tratadas com 4NQO apresentavam histologia normal, compostas por músculo estriado esquelético arranjado em feixes longitudinais, transversais e verticais. A superfície era recoberta por uma membrana mucosa. A porção ventral era revestida por epitélio estratificado pouco ou não queratinizado. A superfície dorsal era revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O sulco terminal em V era composto pelas papilas circunvaladas. A região anterior apresentava as papilas filiformes (mais abundantes) (FIG 37) e fungiformes (FIG 38) e nas bordas uma série de papilas foliadas onde associam-se os botões gustativos nas paredes adjacentes da papila. O tecido conjuntivo era frouxo. As glândulas presentes eram serosas, mucosas e seromucosas. Os ácinos glandulares serosos e mucosos eram abundantes na região faríngea.

O tratamento com 4NQO aumentou significativamente ( $p < 0.05$ ) as alterações linguais. Com a associação do tratamento com 4NQO e CsA, o número de alterações linguais foi predominantemente maior quando comparado aos demais grupos.

A tabela 7 mostra as alterações observadas microscopicamente na língua das ratas dos grupos estudados, com valores expressos em porcentagem.

**Tabela 7.** Alterações microscópicas presentes na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA, expressas em porcentagem. Os números de 1 a 8 expressam as alterações microscópicas observadas.

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7 e 8</b>
4NQO + CsA	100 A	92,8 A	71,4 A	64,2 A	57,1 A	71,4 A	0
4NQO	83,3 A	83,3 A	83,3 A	16,6 AB	33,3 AB	33,3 AB	0
Controle	0 B	0 B	0 B	0 B	0 C	0 BC	0
CsA	0 B	0 B	0 B	0 B	0 BC	0 C	0

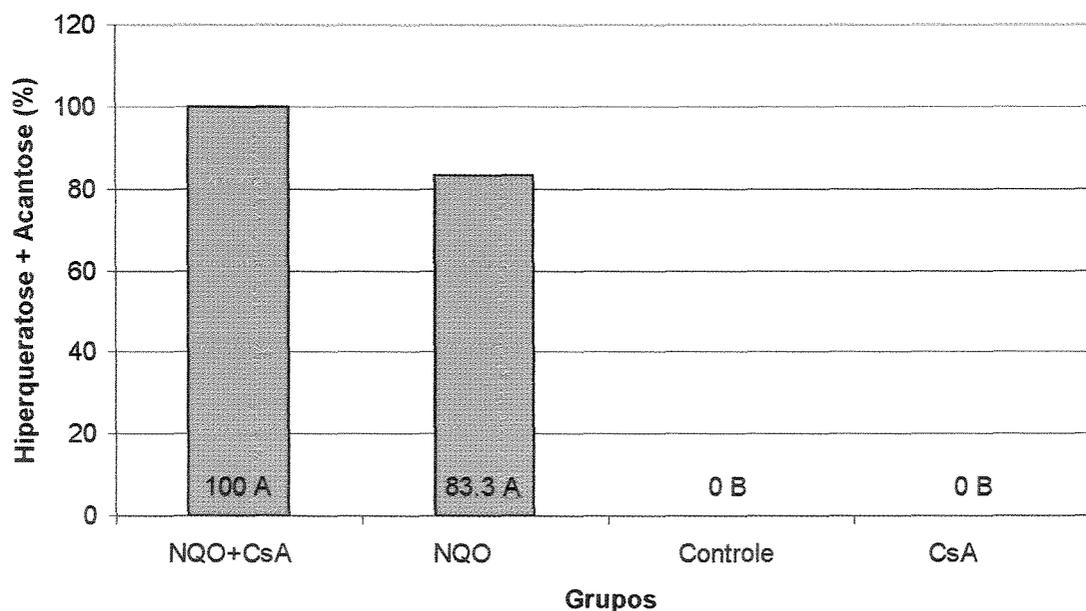
1-hiperqueratose e acantose; 2-displasia leve; 3-displasia moderada; 4-displasia severa; 5-carcinoma microinvasivo; 6-carcinoma espinho celular grau I; 7-carcinoma espinocelular grau II; 8-carcinoma espinocelular grau III.

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% (p<0.05)

Estes resultados serão explicados separadamente, a seguir.

#### 2.4.3.1.1- Língua - Hiperqueratose e acantose

A porcentagem de hiperqueratose e acantose presente nas línguas das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi superior à das ratas tratadas somente com 4NQO, porém não significativamente estatístico. Entretanto, ambas foram significativamente superiores às porcentagens dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 31).

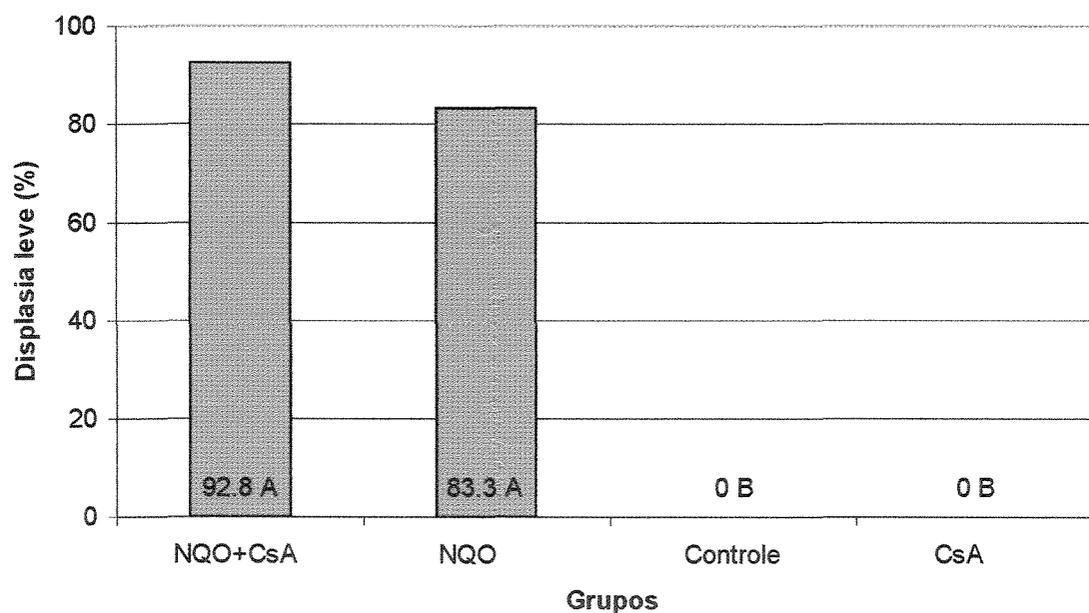


**Figura 31.** Gráfico da porcentagem da variável Hiperqueratose e Acantose, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

### 2.4.3.1.2- Língua - Displasia leve

A porcentagem de displasia leve presente na língua das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi superior à das ratas tratadas somente com 4NQO, porém não teve significado estatístico. Entretanto, ambas foram significativamente superiores às porcentagens dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 32).

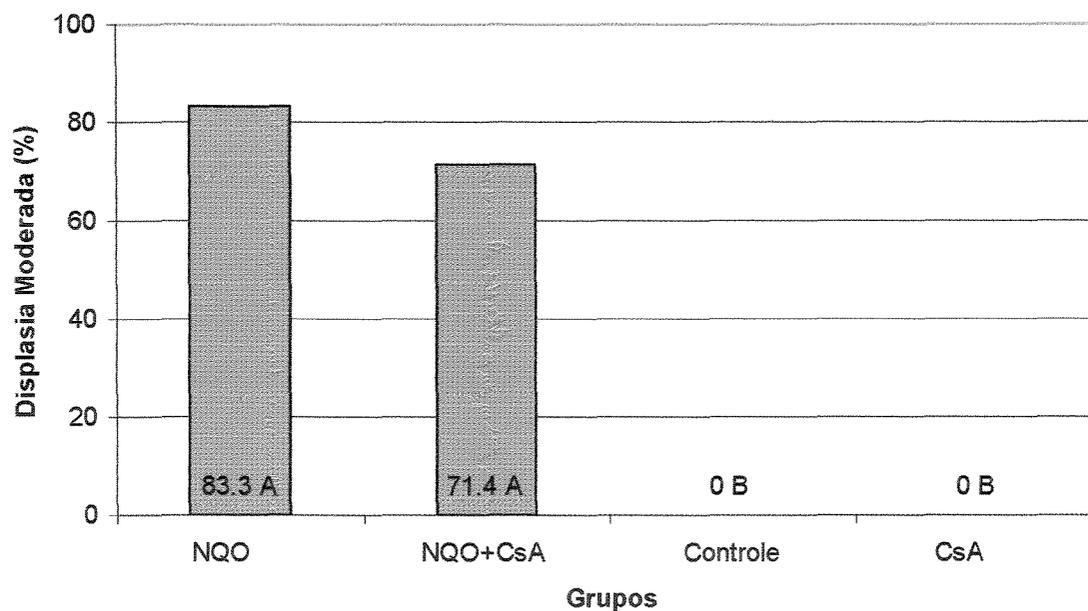


**Figura 32.** Gráfico da porcentagem da variável Displasia Leve, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 2.4.3.1.3- Língua - Displasia moderada

A porcentagem de displasia moderada presente na língua das ratas do grupo tratadas com 4NQO foi superior à das ratas tratadas com 4NQO e CsA, porém não teve significância estatística. Entretanto, ambas foram significativamente superiores às porcentagens dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 33).

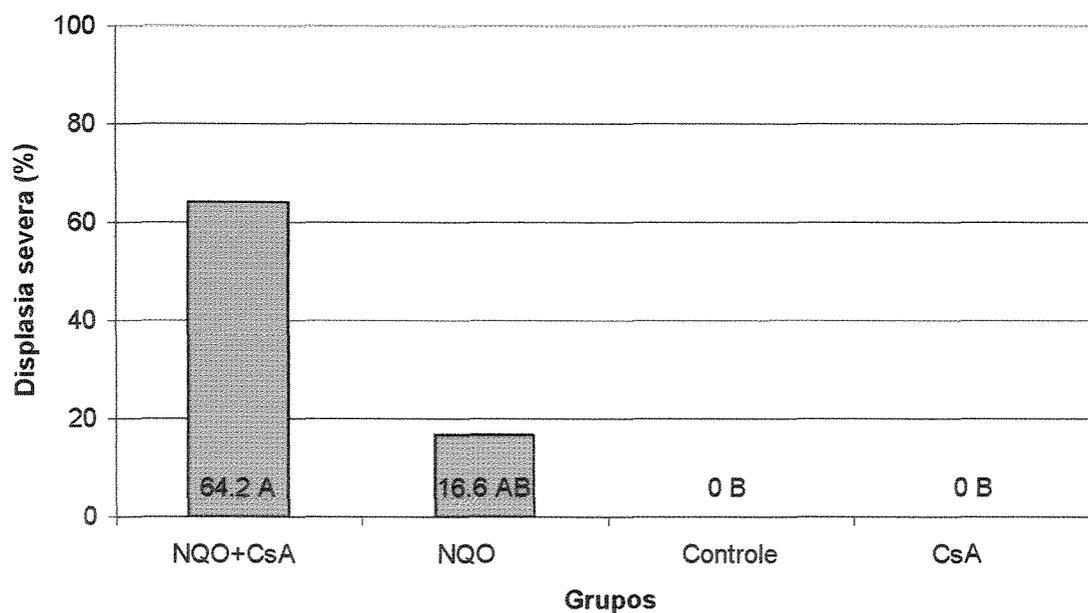


**Figura 33.** Gráfico da porcentagem da variável Displasia moderada, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.1.4- Língua - Displasia severa

A porcentagem de displasia severa presente na língua das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior às das ratas dos grupos Controle e CsA. Também foi superior à porcentagem do grupo de ratas tratadas somente com 4NQO, porém não houve diferença estatística. Além disso, não houve diferença entre as porcentagens de displasia severa do grupo de ratas tratadas com 4NQO (FIG 39) e dos grupos CsA e Controle, as quais não diferiram entre si (FIG 34).

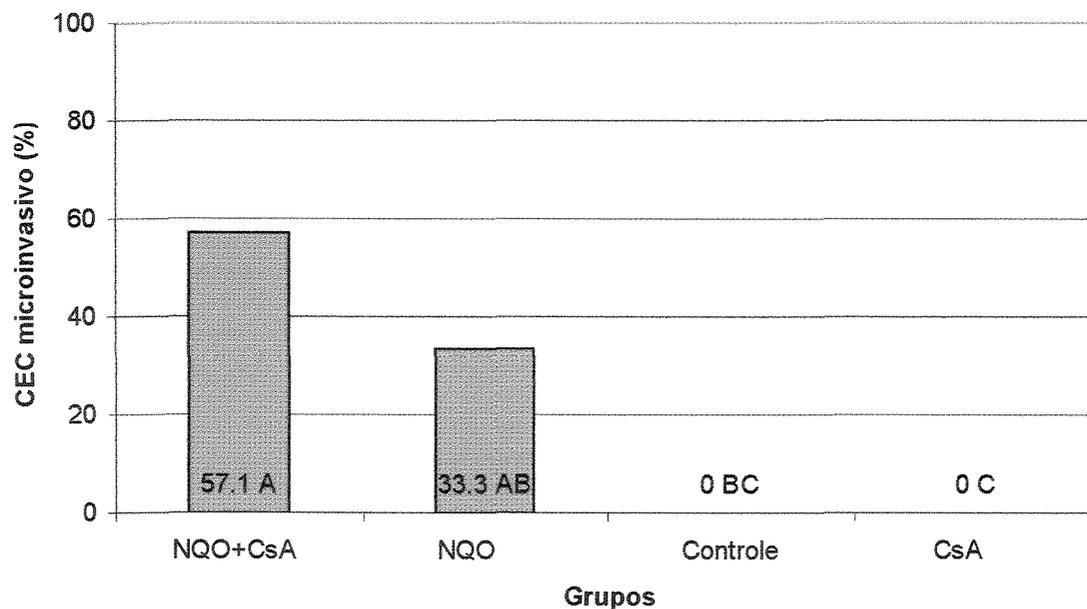


**Figura 34.** Gráfico da porcentagem da variável Displasia severa, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 2.4.3.1.5- Língua - Carcinoma espinocelular microinvasivo

A porcentagem de CEC microinvasivo do grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA (FIG 42) foi significativamente maior que a dos grupos controle e CsA, as quais não diferiram entre si. Embora a porcentagem de presença de CEC microinvasivo do grupo tratadas com a associação de 4NQO e CsA também tenha sido maior do que a do grupo ratas tratadas com 4NQO (FIG 40 e 41), não houve diferença estatística entre ambos. Além disso, a porcentagem do grupo de ratas tratadas somente com 4NQO foi superior a dos grupos CsA e Controle, porém diferiu significativamente apenas do Controle (FIG 35).

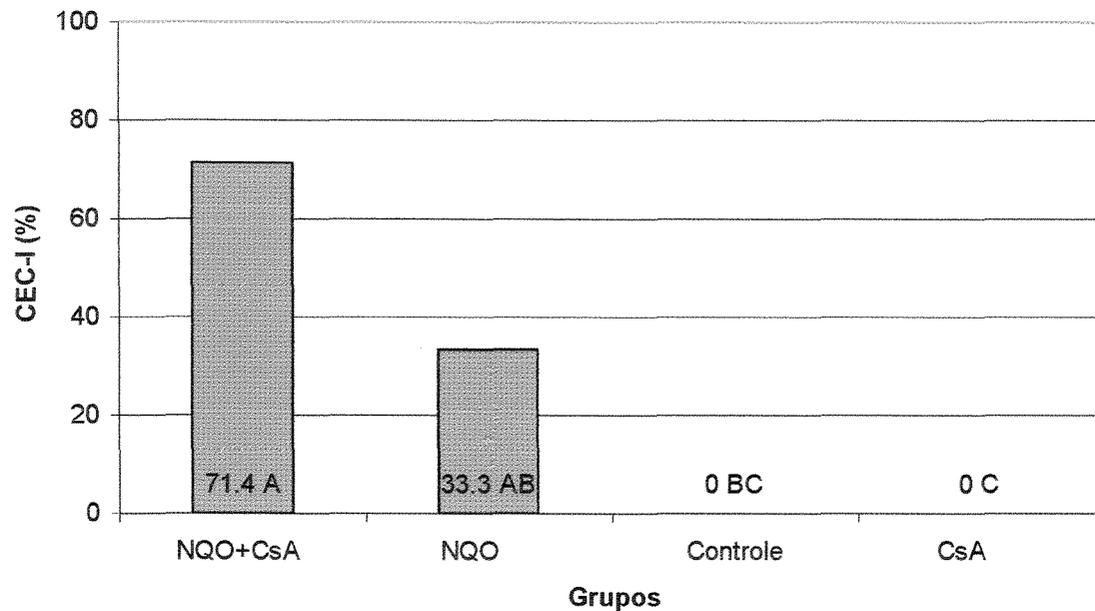


**Figura 35.** Gráfico da porcentagem da variável CEC microinvasivo, presente na língua das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e tratadas com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.1.6- Língua - Carcinoma espinocelular grau I

A FIG 36 mostra que houve diferença significativa entre a porcentagem de CEC grau I no grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA e a dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si. Embora a porcentagem de presença de CEC grau I do grupo de ratas tratadas com ambas as drogas tenha sido superior à do grupo tratado com 4NQO, não houve diferença estatística entre ambos. Também verificou-se que a porcentagem destas lesões no grupo de ratas tratadas somente com 4NQO foi superior a dos grupos CsA e Controle, porém diferiu significativamente apenas do grupo tratado com CsA. É importante ressaltar que vários carcinomas espinocelulares deste trabalho apresentaram uma quantidade exuberante de pérolas de queratina no interior do tecido conjuntivo (FIG 43 a 45).

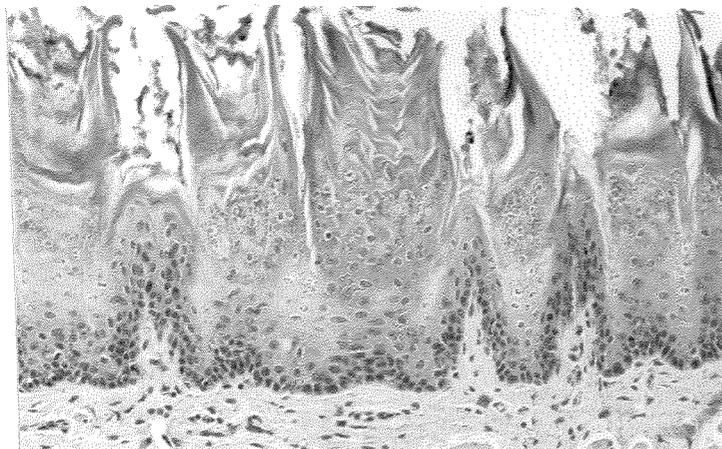


**Figura 36.** Gráfico da porcentagem da variável CEC grau I, presente nas ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou NQO e com NQO+CsA

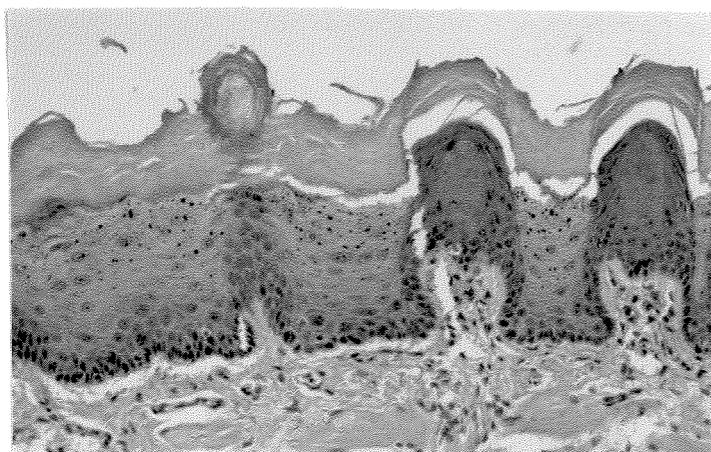
\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.1.7- Língua - Carcinoma espinocelular grau II e III

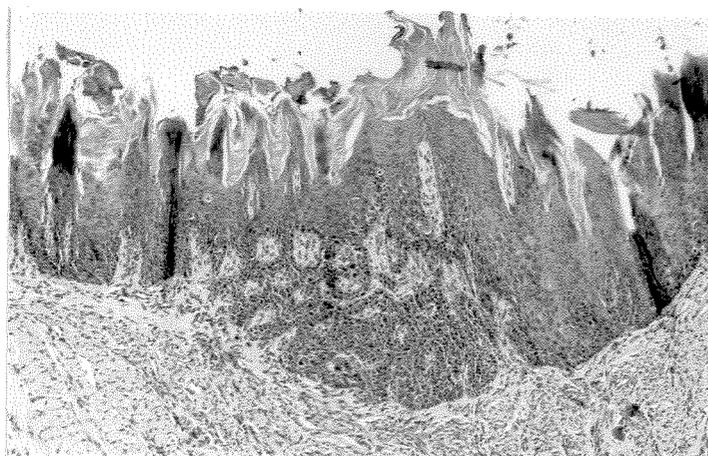
Não houve diferenças significativas entre as médias de CEC grau II e CEC grau III nos diversos grupos estudados.



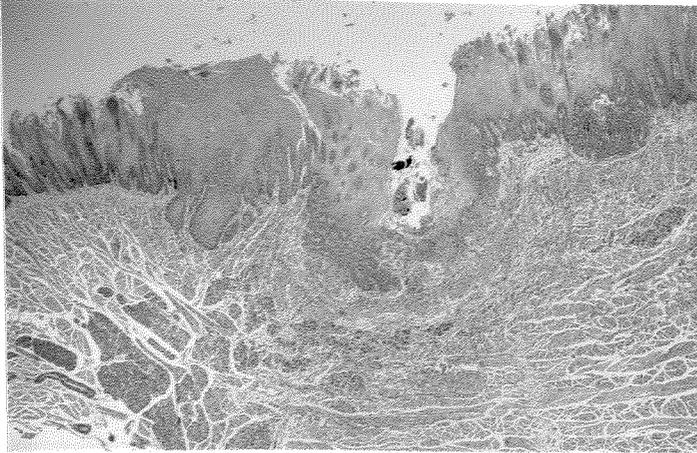
**Figura 37-** Aspecto microscópico da região dorsal da língua de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos, apresentando epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, formando as papilas filiformes. (8,0 x 1,25 x 16)



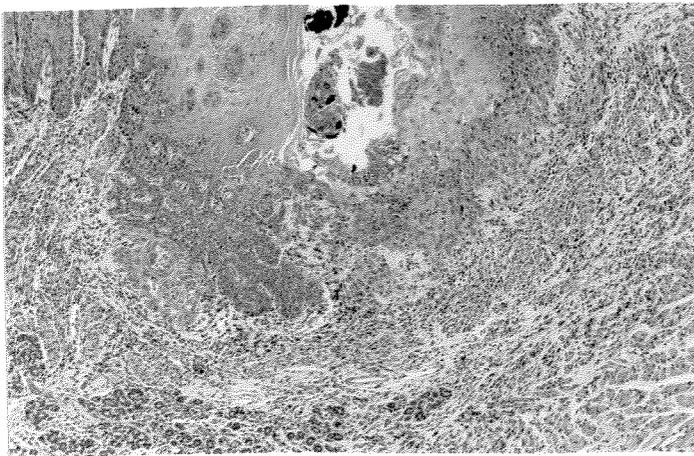
**Figura 38-** Aspecto microscópico da região dorsal da língua de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos, apresentando epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, formando as papilas foliáceas. (8,0 x 1,25 x 16)



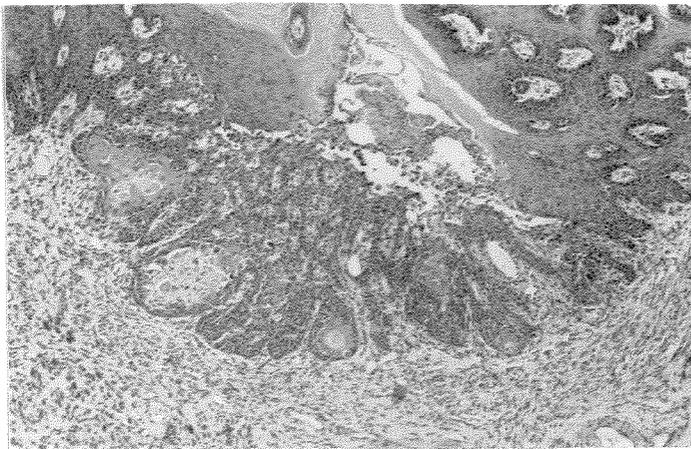
**Figura 39-** Aspecto microscópico da língua de rata tratada com 4NQO, apresentando hiperplasia epitelial e desorganização da camada basal do epitélio, caracterizando displasia moderada. (8,0 x 1,25 x 2,5)



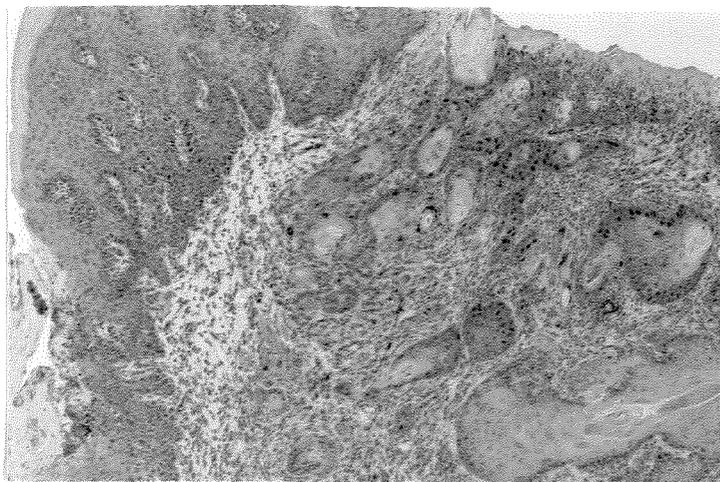
**Figura 40-** Aspecto microscópico da região posterior da língua de rata tratada com 4NQO, apresentando lesão endofítica com hiperqueratose, acantose e desorganização da camada basal do epitélio infiltrando o tecido conjuntivo. Há presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear. (8,0 x 1,25 x 2,5)



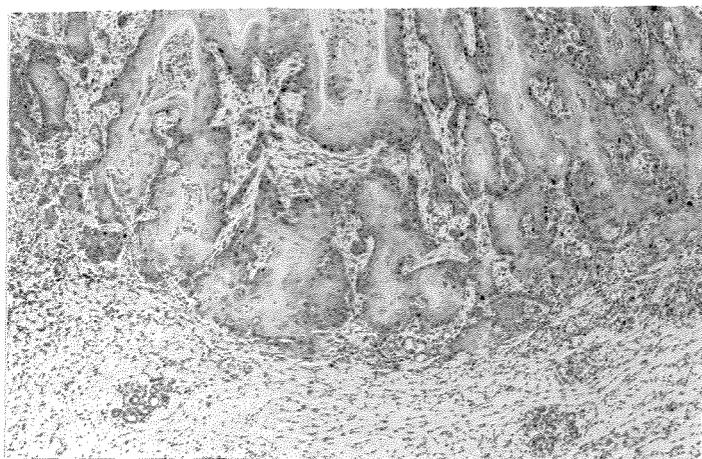
**Figura 41-** Maior aumento da figura anterior mostrando desorganização e hiperplasia da camada basal do epitélio, com células epiteliais infiltrando no conjuntivo. (8,0 x 1,25 x 6,3)



**Figura 42-** Aspecto microscópico da língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando hiperplasia epitelial, acantose e desorganização da camada basal do epitélio infiltrando o tecido conjuntivo, com formação de pérolas córneas, caracterizando um carcinoma espinocelular microinvasivo (8,0x 1,25 x 6,3)

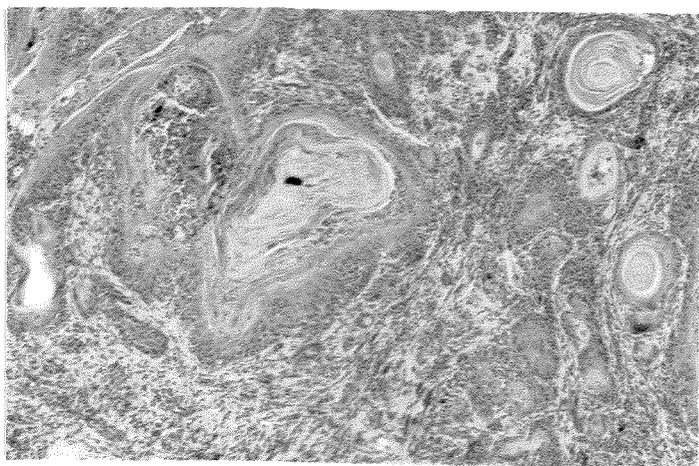


**Figura 43-** Aspecto microscópico da língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando desorganização e rompimento da camada basal do epitélio, e ilhas de células epiteliais invadindo o tecido conjuntivo, além de pérolas córneas. (8,0 x 1,25 x 6,3)



**Figura 44-** Aspecto microscópico da a língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando invasão de ninhos de células epiteliais para o tecido conjuntivo, formando ilhas e cordões. Há presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



**Figura 45-** Aspecto microscópico da a língua de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando ninhos de células epiteliais e abundância de pérolas de queratina no interior do tecido conjuntivo. (8,0 x 1,25 x 6,3)

### 2.4.3.2- Palato

Os palatos das ratas do grupo Controle e os das ratas tratadas com CsA não tiveram alterações, após 240 dias de tratamento.

Estes palatos que não receberam tratamento com 4NQO apresentavam-se com histologia normal. O palato duro era revestido por uma mucosa mastigatória firmemente ligada ao osso subjacente constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (FIG 52 e 53). O tecido conjuntivo apresentava-se denso com figuras vasculares de diversos calibres.

O palato mole era constituído por uma membrana mucosa. O epitélio era ciliado, cilíndrico pseudoestratificado, com células caliceformes na região faríngea e pavimentoso estratificado, com abundância de glândulas mucosas na porção bucal.

O tratamento somente com 4NQO e coma associação de 4NQO e CsA aumentou significativamente ( $p < 0.05$ ) as alterações palatinas. A tabela 8 apresenta as alterações observadas microscopicamente no palato das ratas dos grupos estudados. Os valores estão expressos em porcentagem.

**Tabela 8.** Alterações microscópicas presentes no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA, expressas em porcentagem. Os números de 1 a 8 expressam as alterações microscópicas observadas.

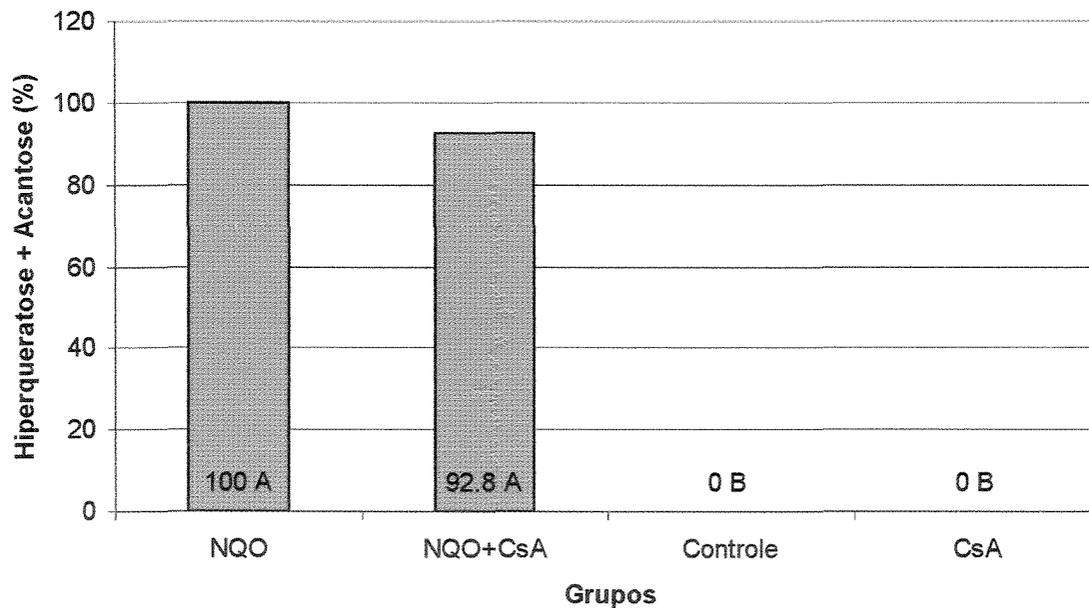
Grupo	1	2	3	4	5	6	7 e 8
4NQO + CsA	92,8 A	78,5 A	85,7 A	50 A	50 A	64,2 A	0
4NQO	100 A	33,3 A B	16,6 B	83,3 A	33,3 A B	33,3 A B	0
CsA	0 B	0 B C	0 B	0 B	0 B C	0 B C	0
Controle	0 B	0 C	0 B	0 B	0 C	0 C	0

1-hiperqueratose e acantose; 2-displasia leve; 3-displasia moderada; 4-displasia severa; 5-carcinoma microinvasivo; 6-carcinoma espinocelular grau I; 7-carcinoma espinocelular grau II; 8-carcinoma espinocelular grau III.

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ )

### 2.4.3.2.1- Palato - Hiperqueratose e acantose

A porcentagem de hiperqueratose e acantose (FIG 54) presente no palato das ratas tratadas com 4NQO foi superior à das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA, porém não teve significância estatística. Entretanto, ambas foram significativamente superiores às médias dos grupos de ratas Controle e tratadas somente com CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 46).

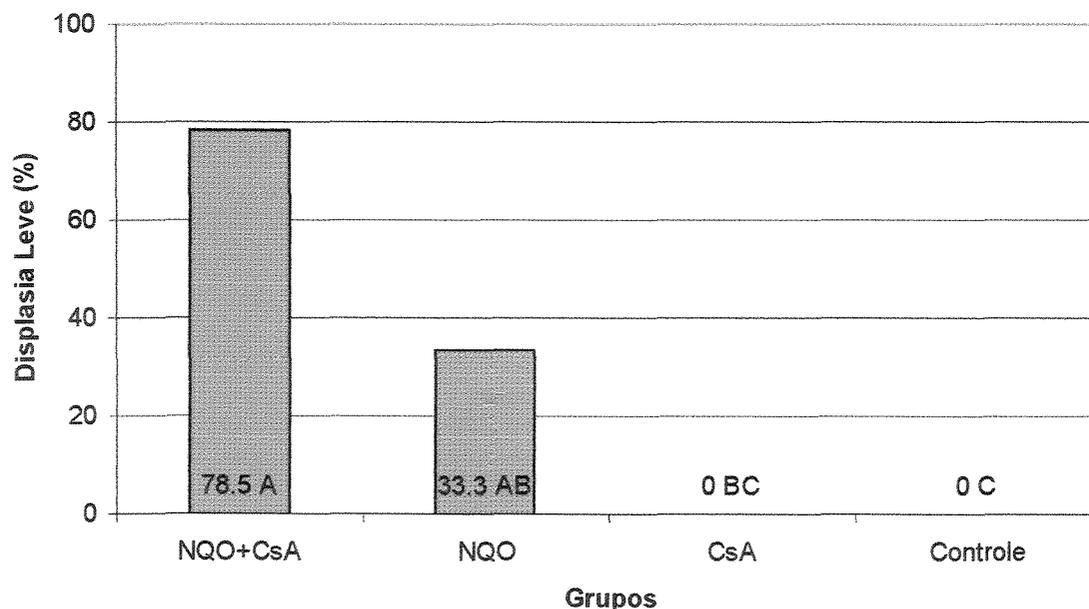


**Figura 46.** Gráfico da porcentagem da variável hiperqueratose e acantose, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.2.2- Palato - Displasia leve

A porcentagem de displasia leve (FIG 55) presente no palato das ratas do grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente maior que a dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si. Embora a porcentagem de presença de displasia leve do grupo tratado com ambas as drogas também tenha sido maior do que a do grupo tratado com 4NQO, não houve diferença estatística entre ambos. Também observou-se que a porcentagem do grupo de ratas tratadas somente com 4NQO foi superior a dos grupos CsA e Controle, porém diferiu significativamente apenas do Controle (FIG 47).

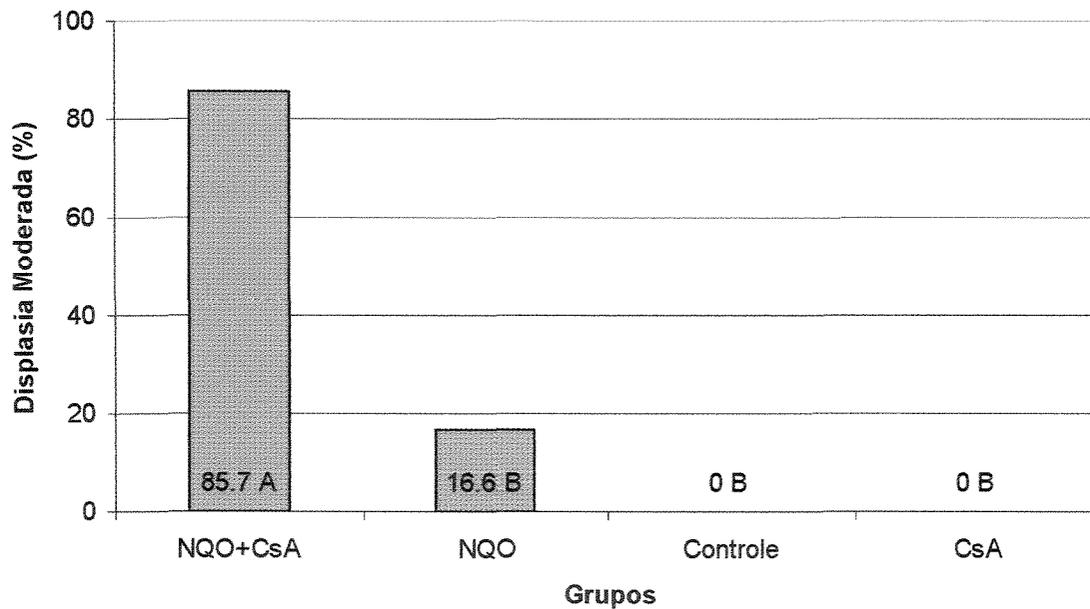


**Figura 47.** Gráfico da porcentagem da variável displasia leve, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 2.4.3.2.3- Palato - Displasia moderada

A porcentagem de displasia moderada (FIG 58) presente no palato do grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente maior do que as porcentagens dos demais grupos. Não houve indícios de diferenças significativas entre as porcentagens dos demais grupos (FIG 48).

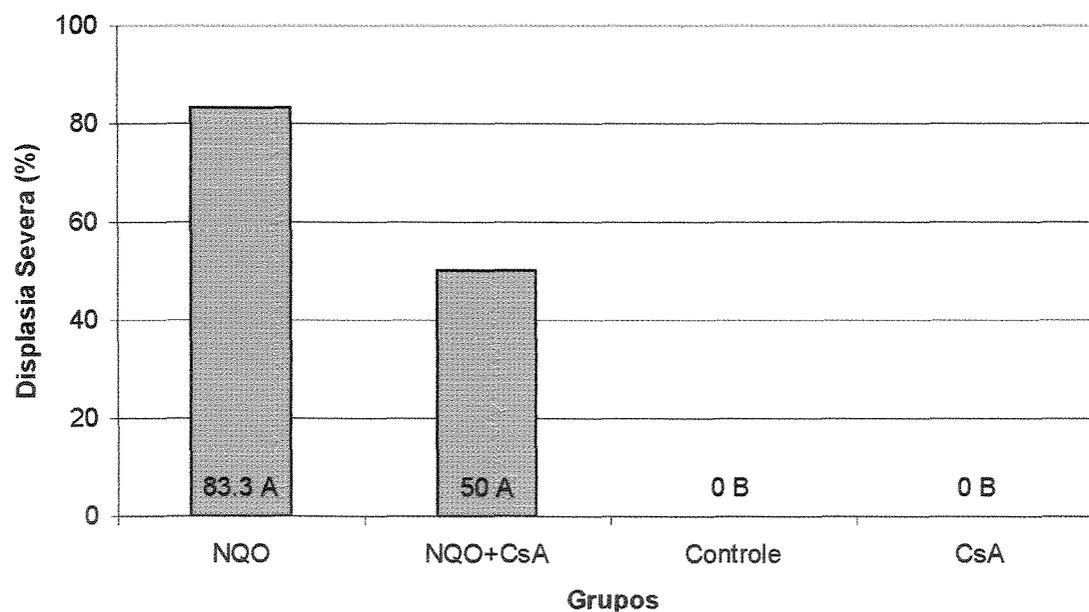


**Figura 48.** Gráfico da porcentagem da variável displasia moderada, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.2.4- Palato - Displasia severa

A porcentagem de displasia severa presente no grupo de ratas tratadas com 4NQO foi superior à das ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA, porém não teve significância estatística. Entretanto, ambas foram significativamente superiores às porcentagens dos grupos Controle e CsA, os quais não diferiram entre si (FIG 49).

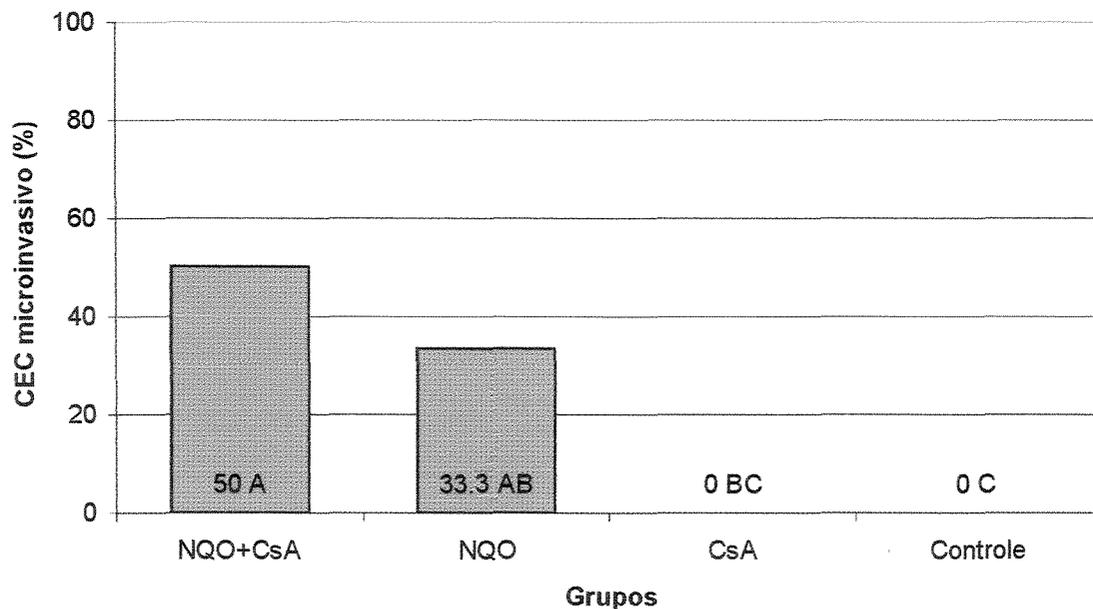


**Figura 49.** Gráfico da porcentagem da variável displasia severa, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.2.5- Palato - CEC microinvasivo

A porcentagem de CEC microinvasivo do grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente maior que a dos grupos controle e CsA, os quais não diferiram entre si. Embora a porcentagem de presença de CEC microinvasivo do grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA também tenha sido maior do que a do grupo tratado com 4NQO, não houve diferença estatística entre ambos. Também observou-se que a porcentagem do grupo de ratas tratadas somente com 4NQO foi superior a dos grupos CsA e Controle, porém diferiu significativamente apenas do Controle (FIG 50).

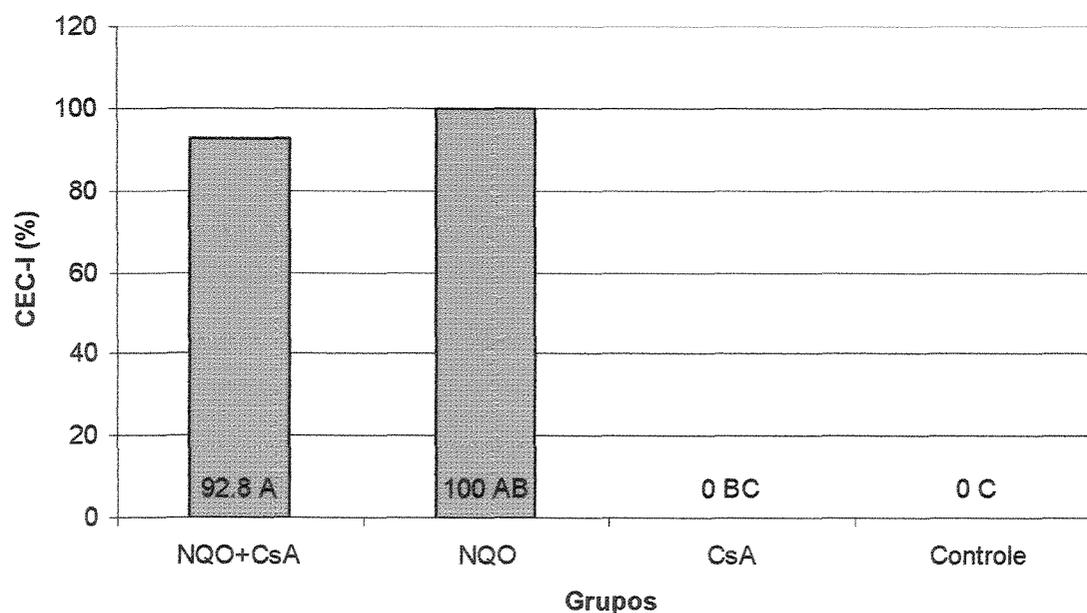


**Figura 50.** Gráfico da porcentagem da variável CEC microinvasivo, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.3.2.6- Palato - Carcinoma espinocelular grau I

A porcentagem de CEC grau I presente no grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA (FIG 56, 57, 59 e 60) apresentou um valor significativamente superior às porcentagens dos grupos Controle e CsA. Embora a porcentagem de CEC grau I presente no grupo de ratas tratadas com ambas as drogas tenha sido maior do que a do grupo de ratas tratadas com 4NQO, não houve diferença estatística entre ambos. Também observou-se que a porcentagem de CEC grau I presente no grupo 4NQO foi superior a dos grupos CsA e Controle, porém diferiu significativamente apenas do Controle (FIG 51).

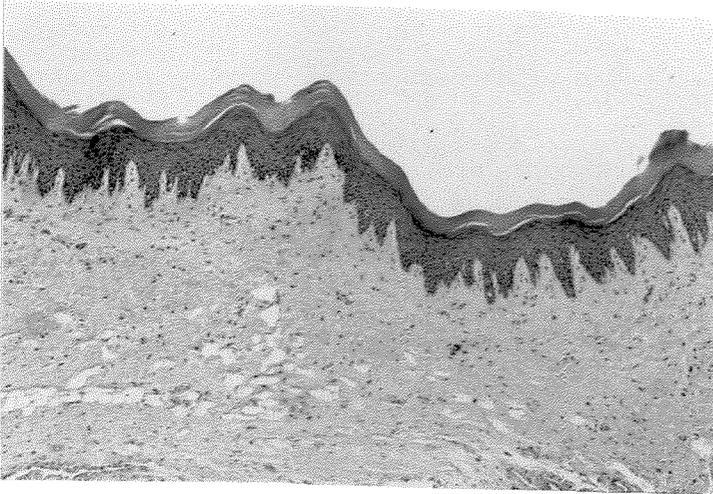


**Figura 51.** Gráfico das médias de postos (em escores) da variável CEC grau I, presente no palato das ratas dos grupos Controle, tratadas com CsA ou 4NQO e com 4NQO+CsA

\* Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon com nível de significância alfa de 5% ( $p < 0,05$ ).

2.4.3.2.7- Palato - Carcinoma espinocelular grau II e III

Não houve indícios de que existam diferenças significantes entre as médias de CEC-II e CEC-III nos diversos grupos estudados.



**Figura 52-** Aspecto microscópico da região anterior do palato de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos, apresentando epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e tecido conjuntivo denso.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



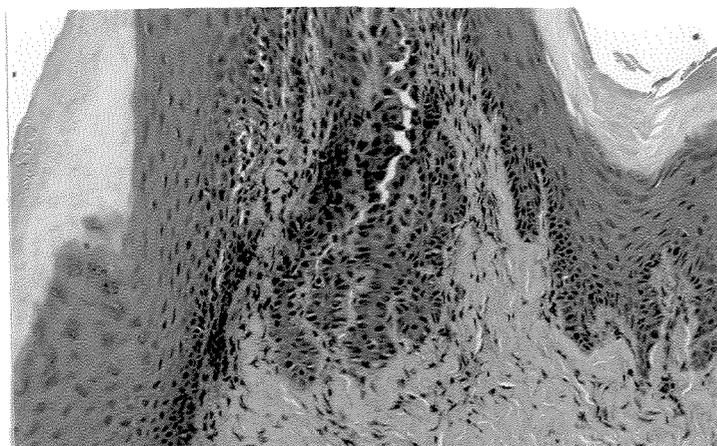
**Figura 53-** Aspecto microscópico da região posterior do palato de rata que não recebeu nenhum dos tratamentos, apresentando epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e tecido conjuntivo denso, com figuras vasculares de diversos calibres.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



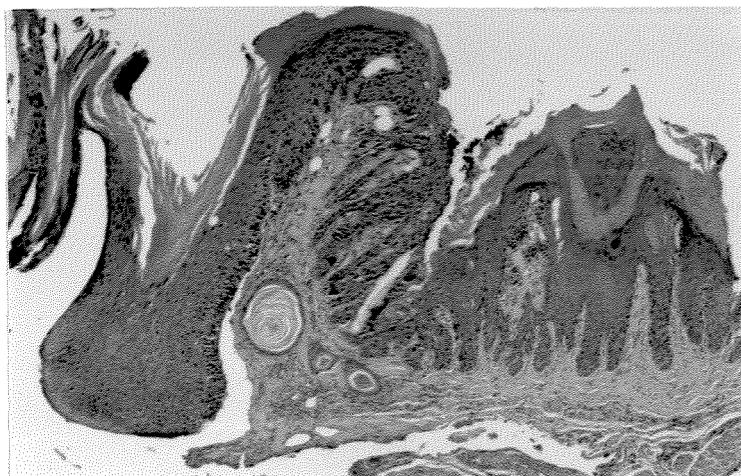
**Figura 54-** Aspecto microscópico do palato de rata tratada com 4NQO, apresentando acantose, hiperplasia da camada espinhosa do epitélio com longas interdigitações para o interior do tecido conjuntivo, o qual se apresenta com aspecto de normalidade.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



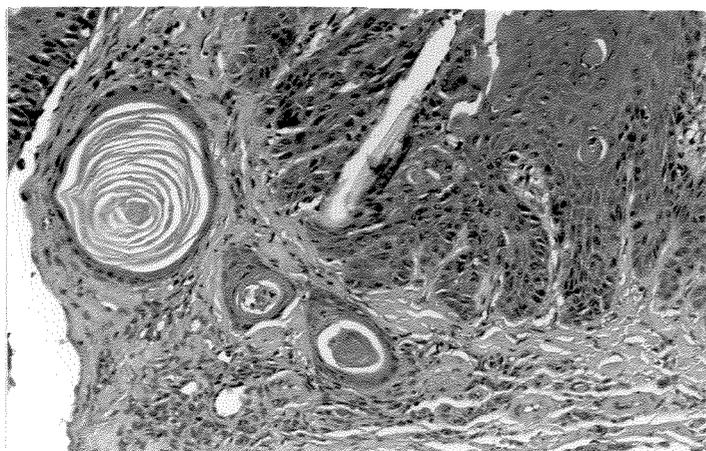
**Figura 55-** Aspecto microscópico do palato de rata tratada com 4NQO, apresentando epitélio acantótico, fenda suprabasal e desorganização da camada basal do epitélio.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



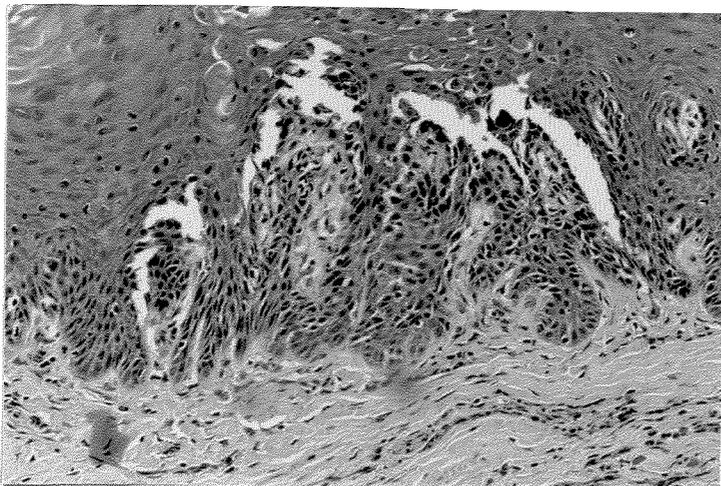
**Figura 56-** Aspecto microscópico do palato de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando hiperqueratose, acantose, desorganização da camada basal do epitélio e invasão do tecido conjuntivo, com ninhos de células epiteliais, pérolas córneas e intenso infiltrado inflamatório mononuclear.

(8,0x 1,25 x 2,5)



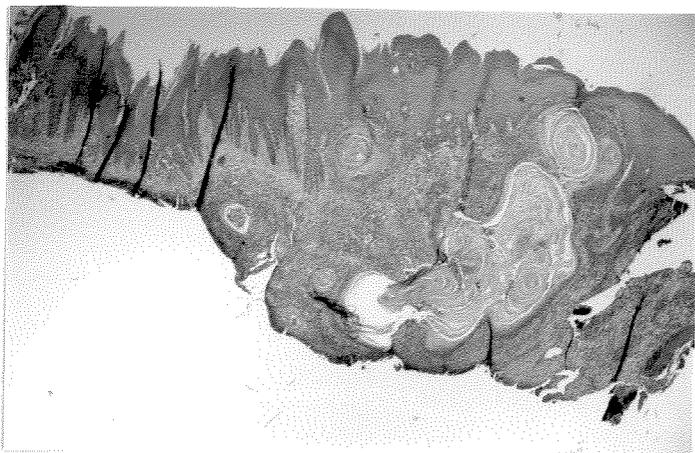
**Figura 57-** Maior aumento da figura anterior mostrando acantose, desorganização e rompimento da camada basal. Há presença de pérolas de queratina, ninhos de células epiteliais e infiltrado inflamatório crônico.

(8,0x 1,25 x 6,3)



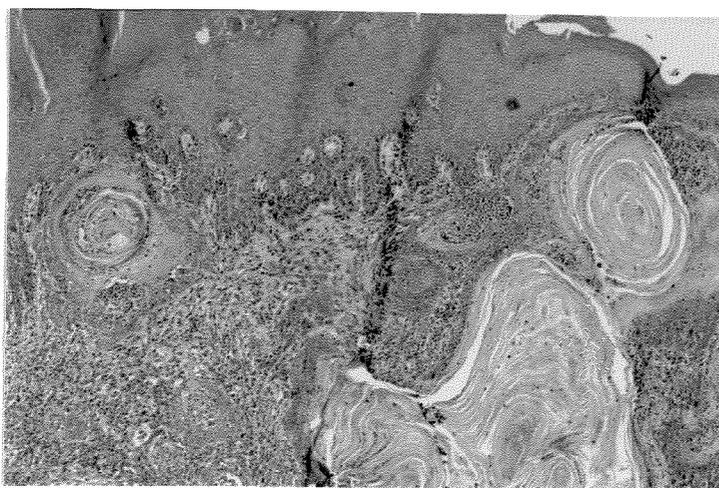
**Figura 58-** Aspecto microscópico do palato de rata tratada com 4NQO, apresentando epitélio acantótico, ceratinização epitelial individual, fenda suprabasal e desorganização da camada basal do epitélio.

(8,0 x 1,25 x 6,3)



**Figura 59-** Aspecto microscópico do palato de rata tratada com 4NQO e CsA, apresentando hiperqueratose, acantose, desorganização da camada basal do epitélio e invasão do tecido conjuntivo, com ninhos de células epiteliais, pérolas córneas e intenso infiltrado inflamatório mononuclear.

(8,0x 1,25 x 2,5)



**Figura 60** Maior aumento da figura anterior mostrando acantose, desorganização e rompimento da camada basal. Há presença de pérolas de queratina exuberantes, ninhos de células epiteliais e infiltrado inflamatório crônico.

(8,0x 1,25 x 6,3)

## *Discussão*

## **2.5- DISCUSSÃO**

Vários relatos associam o uso da CsA com o desenvolvimento de várias lesões tanto malignas (ex. linfomas, sarcoma de kaposi e carcinomas) (PENN, 1996) ) como benignas (ex. aumento gengival (PAGE et al., 1986)). Dessa forma, neste trabalho fez-se um estudo da associação da carcinogênese através do 4NQO com a imunossupressão pela CsA em ratas.

### **2.5.1- RATAS**

É bem estabelecido o uso de animais experimentais para o estudo com drogas imunossupressoras como a CsA (SANGALLI et al., 1988; SPOLIDÓRIO et al., 2001). Dentre esses animais, o mais utilizado são ratos, de diversas raças. Neste estudo, optou-se por utilizar ratas da raça Wistar, baseando-se no trabalho de MOLCEPERES et al. (2000) que demonstraram que não há diferenças significativas para que se contra-indique o uso de fêmeas em experimentos com CsA.

Quanto à raça das ratas, FISHER et al. (1990) consideraram que o rato da raça Wistar é menor, de fácil manuseio e apresenta menor índice de mortalidade e doenças intercorrentes quando comparado ao Sprague-Dawley. Este relato colaborou para a escolha dessa raça de ratas. As ratas Wistar mostraram-se susceptíveis à ação do 4NQO e adequadas para este modelo experimental.

## **2.5.2- CICLOSPORINA A**

Neste trabalho, a ciclosporina A (CsA) foi injetada do tecido cutâneo da região dorsal, na concentração de 10 mg/Kg peso corporal/dia. Esta concentração foi baseada no trabalho de WASSEF et al. (1985), que mostraram que a dose de 10mg/kg/peso corporal/dia é bem tolerada pelo rato, mantendo uma concentração sérica constante. Em humanos, a concentração da CsA no sangue para uma eficiente imunossupressão, em pacientes transplantados renais, está entre 300 e 700 ng/ml, que corresponde aproximadamente a 4,5 e 10 mg/Kg peso corporal/dia (DELILERS et al., 1986). No tratamento de diabetes a CsA é usada na dose de 70 a 204 ng/ml ou 1 a 3,5 mg/kg de peso corporal/dia (DALEY et al., 1986). Em crianças submetidas a transplante hepático, a concentração plasmática para uma eficiente imunossupressão está em torno de 192 ng/ml ou 3mg/Kg de peso corporal/dia (ROSS et al., 1986).

Para se estabelecer a dose imunossupressora efetiva para cada indivíduo, o monitoramento sérico é importante, e pode ser feito através de radioimunoensaio ou cromatografia líquida de alta pressão (BUOPANE, 1990). Em animais de laboratório, a CsA tem sido usada por via intramuscular, oral, intraperitoneal e subcutânea. Em ratos e cães, a administração oral resulta numa deficiente absorção, e inadequada concentração sérica para induzir imunossupressão (WASSEF et al., 1985; SEIBEL et al., 1989). Com a administração intraperitoneal, obtém-se elevados picos séricos de CsA, induzindo muitas vezes hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (WASSEF et al., 1985).

### **2.5.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4NQO)**

O óxido de nitroquinolina (4NQO) diluído a 0,5% em propilenoglicol foi pincelado na boca das ratas não anestesiadas, 3 vezes por semana. Este modelo de carcinogênese experimental foi introduzido por WALLENIUS & LEKHOLM em 1976.

Está bem estabelecido na literatura que a aplicação crônica de 4NQO na mucosa bucal leva ao desenvolvimento de carcinomas e o período de aplicação, assim como a dose modificam a quantidade e o período de formação das lesões (SVENSON & HEIDEN, 1982). Além disso, o tempo de contato do carcinógeno com a mucosa bucal também é de fundamental importância (SVENSON & HEIDEN, 1982). Por esta razão, após cada aplicação do 4NQO as ratas permaneciam 2 horas sem beber água.

FISKER et al. (1987) demonstraram que quanto menor a dose do carcinógeno, maior o tempo para o surgimento do primeiro carcinoma. SANTOS (1999) pincelou ratos com 4NQO a 0,5% em propilenoglicol por 4 meses e obteve o primeiro carcinoma após 3 meses, totalizando 7 meses desde o início da aplicação do 4NQO.

Quanto ao método de aplicação, WONG & WILSON (1983) realizaram as aplicações com os animais anestesiados. No entanto, FISKER et al. (1990) consideraram vantagem trabalhar com os animais não anestesiados pois anestésias sucessivas acarretam o risco de complicações sistêmicas que podem causar a morte do animal.

#### **2.5.4- PERÍODO DE SOBREVIDA**

Durante o período do experimento, algumas ratas morreram antes do prazo previsto para o sacrifício (240 dias). Todas as ratas que morreram estavam recebendo algum dos tratamentos, sendo que o grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi o mais afetado, com 57,6% de mortes. Também morreram ratas dos grupos que estavam recebendo tratamentos isolados com 4NQO ou CsA, chegando a 45,4% e 28,5%, respectivamente.

O grupo da associação dos tratamentos 4NQO e CsA também apresentou um menor período de sobrevida, com média de 142,42 dias, visto que o grupo controle teve uma média de 240 dias e os grupos de ratas tratadas com 4NQO ou tratadas com CsA, médias 192,42 e 183,18 dias, respectivamente.

Esses fatos podem estar associados com o uso prolongado da CsA, apesar de ter sido utilizada a dose e via de administração (10mg/Kg peso corporal/dia via subcutânea) estabelecidas por WASSEF et al., (1985) e utilizadas por SPOLIDÓRIO et al. (2001). Entretanto, esses autores utilizaram a CsA em períodos menores, por aproximadamente 60 dias.

Os efeitos tóxicos da ciclosporina A (CsA) no rato estão bem estabelecidos na literatura. Sabe-se que o tratamento com esta droga afeta a pele, o sistema nervoso central, a gengiva, o fígado e, principalmente os rins (RYFFEL, 1986; MYERS, 1986). Neste trabalho observou-se alterações hepáticas, renais, gengivais e cutâneas (dados não apresentados), que eventualmente poderiam estar colaborando com a menor sobrevida destes animais.

Quanto ao 4NQO, KITANO et al. (1992) relataram que quando diluído a 0,001% na água de beber da raça de ratos Wistar-Furth, a sobrevida média foi de 238,24 dias. Neste estudo, a média de sobrevida das ratas tratadas com 4NQO foi menor do que a relatada por KITANO et al (1992), porém a concentração e o método de aplicação da droga também diferiram.

Quanto às ratas tratadas somente com CsA, houve uma sobrevida média de 192,42 dias e 28,5% das ratas morreram antes de 240 dias. No estudo de RYFFEL et al. (1983), a CsA foi administrada com diferentes concentrações (variando de 0 a 8 mg/Kg peso corporal/dia) em ratos, e foi observado que 68% dos animais morreram após 95 semanas, devido principalmente à nefropatia progressiva.

Neste estudo, o grupo de ratas tratadas com a associação de CsA e 4NQO tiveram uma média de sobrevida menor e a porcentagem de ratas mortas maior quando comparado aos outros grupos. A partir desses fatos, pode-se aventar a hipótese de que ambos os tratamentos associados por longo período de tempo podem ser deletérios, por seus efeitos colaterais já descritos anteriormente.

#### **2.5.5- PESO DOS ANIMAIS**

No presente trabalho, observou-se que a média de ganho de peso corporal, das ratas tratadas somente com 4NQO e tratadas com a associação de 4NQO e CsA, foi significativamente menor quando comparado a dos grupos Controle e tratadas somente com CsA.

É importante relatar que os sinais de debilidade física e perda de peso corporal foram observados quando as ratas apresentavam as primeiras lesões na boca, sugerindo maior dificuldade de alimentação e conseqüente emagrecimento, o que também foi observado por STEIDLER & READE (1984).

Além disso, a média de ganho de peso das ratas do grupo tratado com ambas as drogas foi significativamente menor (126,4g) quando comparada a todos os demais grupos (154,6grs).

Estes resultados podem ser decorrentes dos mesmos efeitos colaterais já citados no capítulo anterior (período de sobrevivência).

#### **2.5.6- ASPECTOS MACROSCÓPICOS**

As principais alterações macroscópicas observadas neste experimento foram: alterações das papilas linguais, perda de definição das rugosidades palatinas, mucosa de aspecto esbranquiçado, aspectos papilomatosos e ulcerações. Tais achados estão de acordo com WALLENIOUS (1966), WALLENIOUS & LEKHOLM (1973), LEKHOLM & WALLENIOUS (1976), SVENSON & HEYDEN, (1982) e NAVARRO (1992).

As lesões iniciais eram caracterizadas por presença de mucosa esbranquiçada. Em seguida, puderam ser observadas perda de definição das rugosidades palatinas variando de leves até a perda da arquitetura palatina e alterações das papilas linguais, principalmente atrofia, evoluindo eventualmente para lesões papilomatosas. As características mais agressivas eram úlceras, inicialmente menores evoluindo em diâmetro e profundidade com o decorrer do

experimento. Seqüência semelhante de evolução foi descrita por vários autores (WALLENIOUS, 1966; WALLENIOUS & LEKHOLM, 1973; LEKHOLM & WALLENIOUS, 1976; WALLENIOUS et al., 1979; STEIDLER & READE, 1984; PRIME et al., 1986; NAUTA et al. 1995).

Os principais sítios de aparecimento das lesões foram região de tubérculo intermolar no dorso da língua e região intermolar do palato. Embora o 4NQO seja aplicado somente na mucosa palatina, esta alta incidência de lesões linguais pode ser explicada pelo íntimo contato fisiológico entre a região posterior da língua com a área de aplicação do carcinógeno, fazendo com que ambos os sítios recebam quantidade semelhante de carcinógeno (KUTUZOV & SICHER, 1951; MATTHEWS et al, 1986). Lesões de língua e na região intermolar do palato foram relatadas em todos os trabalhos que usaram este modelo experimental, o que torna evidente sua utilidade para o estudo da carcinogênese de dorso de língua, que entretanto não é freqüente no homem (NAVARRO, 1992).

Embora algumas lesões tenham ocorrido na região anterior da língua, estas foram infreqüentes, sendo mais comuns áreas leucoplásicas e atrofia de papilas linguais. A maior resistência observada na porção anterior da língua deve-se provavelmente à presença de espaços interpapilares pronunciados na região das papilas cônicas simples, os quais são recobertos por queratina mecanicamente mais resistente do que aquela que recobre a extremidade das papilas. Já na região do tubérculo lingual, as papilas filiformes verdadeiras estão distribuídas muito próximas uma das outras, conseqüentemente apresentam espaços interpapilares reduzidos, além de apresentarem camada de queratina

com composição diferente daquela encontrada nos espaços interpapilares da região anterior (KUTUZOV & SICHER, 1951).

Todas as alterações macroscópicas encontradas na língua foram superiores no grupo de ratas tratadas com a associação das drogas 4NQO e CsA, quando comparado ao grupo que recebeu somente o tratamento com 4NQO. A partir destes resultados observados, é possível sugerir que o tratamento com CsA leva a um aumento na susceptibilidade ao desenvolvimento de alterações na língua.

Já no palato, a presença de lesões brancas na mucosa foi superior no grupo de ratas tratadas somente com 4NQO. Entretanto, nas alterações em estágio mais avançado, ou seja, perda de definição das rugosidades palatinas, lesões exofíticas e ulcerações, o grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA apresentou maior porcentagem em relação ao grupo tratado somente com 4NQO. A partir destas observações, é possível sugerir que o tratamento com CsA leva a um aumento no desenvolvimento de alterações macroscópicas em estágios mais avançados no palato. Na literatura pertinente não existem trabalhos que forneçam dados para comparar com os resultados obtidos no presente trabalho.

### **2.5.7- ASPECTOS MICROSCÓPICOS**

Das alterações microscópicas encontradas neste trabalho, o aspecto inicial foi representado pela associação de hiperqueratose e acantose. As lesões intermediárias quanto à gravidade foram as displasias, consideradas como

condições pré-malignas. Estas foram classificadas em leve, moderada e severa de acordo com SMITH & PINDBORG (1969). Os estágios mais avançados, ou seja, as alterações malignas propriamente ditas, foram consideradas nos grupos “carcinoma microinvasivo” e “carcinoma espinocelular invasivo grau I”. Carcinomas espinocelulares grau II e grau III não foram encontrados.

Na língua, as áreas de modificação de papilas eram representadas microscopicamente por aplainamentos, decorrente de hiperqueratose e acantose epitelial. No palato também havia hiperplasia e hiperqueratose que, macroscopicamente eram visualizadas como perda de definição das rugosidades palatinas.

No estudo de FISHER et al. (1990), o resultado da aplicação de 4NQO no palato e língua foi hiperqueratose, considerado como um estágio precoce no processo de carcinogênese. O grau de hiperplasia epitelial aumenta progressivamente com o tempo de aplicação do carcinógeno e, os parâmetros utilizados por este autor indicaram diferenças entre a hiperplasia provocada pelo 4NQO em relação a outras drogas essencialmente hiperplasiogênicas (FISHER et al., 1990).

Neste estudo, considerou-se carcinoma microinvasivo as neoplasias que invadiam discretamente a lâmina própria, o qual pode ser considerado um intermediário entre o carcinoma “in situ” e o carcinoma espinocelular francamente invasivo. Estes critérios também foram utilizados por NAVARRO (1992).

As lesões de palato e língua, de ambos os grupos, eram carcinomas espinocelulares bem diferenciados, com presença de grande quantidade de

pérolas de queratina. Nas línguas foram observadas invasão muscular pelos carcinomas e no palato alguns chegavam até o osso. Estes achados também estão de acordo com NAVARRO (1992) e SANTOS (1999).

Neste estudo, foi observado que as alterações microscópicas encontradas na língua ocorreram em maior número no grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA, quando comparado com o grupo de ratas tratadas somente com 4NQO.

Nos estágios iniciais, como hiperqueratose com acantose e displasia leve, o grupo tratado com a associação das drogas teve maior porcentagem de alterações linguais, porém com uma diferença não tão importante. O único tipo de alteração superior no grupo tratado somente com 4NQO foi o critério displasia moderada, porém também não teve diferença significativa do grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA.

Entretanto, nos estágios mais avançados de alterações microscópicas na língua, como na displasia severa, carcinoma microinvasivo e carcinoma espinocelular invasivo grau I, o grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA teve superioridade numérica em todos os critérios, quando comparados ao grupo de ratas tratadas somente com 4NQO.

Na análise histopatológica dos palatos, as alterações microscópicas encontradas também ocorreram em maior número no grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA, quando comparado com o grupo de ratas tratadas somente com 4NQO.

Nos estágio inicial de hiperqueratose com acantose o grupo tratado somente com 4NQO teve maior porcentagem que o grupo tratado com a associação das drogas, porém com uma diferença não tão importante. Nos estágios de displasia leve e moderada, o grupo tratado com a associação das drogas teve maior porcentagem de alterações em relação ao grupo tratado somente com 4NQO, com uma diferença significativa. No estágio de displasia severa, o grupo tratado somente com 4NQO foi superior ao grupo tratado com a associação de 4NQO e CsA.

Entretanto, a presença de carcinoma microinvasivo e carcinoma espinocelular invasivo grau I no grupo de ratas tratadas com a associação de 4NQO e CsA foi significativamente superior em todos os critérios, quando comparados ao grupo de ratas tratadas somente com 4NQO.

Estes achados permitem sugerir que a administração de CsA potencializou o desenvolvimento das neoplasias malignas na boca das ratas.

Estes achados estão de acordo com REDDI et al. (1991) que relataram que o tratamento com CsA levou a um aumento na incidência de tumores renais em ratos Wistar tratados com estreptozocina ( 7/13 ratos tratados com CsA vs 2/16 ratos controle). PERERA et al. (1986) e JOHNSON et al. (1984) também relataram que a CsA levou a um desenvolvimento mais rápido de tumores no trato gastrointestinal de ratos tratados com os carcinógenos químicos N-metil-N-nitrosourea e N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina, respectivamente. YAMADA et al. (1992) relataram um aumento generalizado de metástases em hamsters tratados com DMBA e CsA quando comparados com hamsters tratados somente com

DMBA. Este aumento das metástases, uma das principais características das neoplasias malignas, caracteriza a potencialização da carcinogênese pela CsA, marcada pela disseminação.

Uma explicação para o maior desenvolvimento de lesões malignas neste estudo pode estar baseada no estudo de HOJO et al. (1999) que demonstraram que células neoplásicas expostas à CsA "in vitro" dividem-se mais facilmente, apresentam mudanças na forma, demonstram mobilidade aumentada e, ao contrário das células normais, podem crescer sem estarem ancoradas a uma superfície sólida. Além disso, quando os autores (HOJO et al., 1999) injetaram diferentes tipos de células tumorais em ratos imunossuprimidos pela CsA, outros tumores secundários se desenvolveram nos pulmões na presença de CsA, o que não ocorreu na ausência da mesma. Em estudos "in vivo" com camundongos, estes autores sugerem que a CsA promove crescimento tumoral por um mecanismo autônomo, independente de qualquer efeito do sistema imune. Eles relataram que a CsA promove a transcrição e expressão do gene do TGF- $\beta$ , e este promove a invasão e metástase de células tumorais. Além disso, eles demonstraram que as lesões eram prevenidas quando os animais foram tratados com anticorpos monoclonais direcionados ao TGF- $\beta$ .

Além disso, HERMAN et al. (2001) demonstraram que a capacidade de reparo do DNA foi reduzida significativamente pela CsA, em estudos "in vivo" e "in vitro". Neste estudo, foram comparadas amostras de pacientes normais (controle), pacientes transplantados tratados com azatioprina e prednisona (terapia dupla) e pacientes transplantados tratados com azatioprina, prednisona e CsA (terapia

tripla). Esses autores mostraram que a CsA acarreta numa diminuição significativa do reparo do DNA quando comparada ao controle e ao tratamento com azatioprina e prednisona, sejam elas administradas isoladamente ou associadas. Sabe-se que a incapacidade de reparo do DNA contribui para a incidência de cânceres pois o reparo representa o principal mecanismo de defesa para a preservação do genoma e prevenção de carcinogênese (HERMAN et al., 2001).

## *Conclusões*

## 2.6- CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados, a associação dos tratamentos com 4NQO e CsA levou a:

- maior número de morte e menor período de sobrevivência das ratas,
- menor ganho de peso corporal dos animais;
- aumento na susceptibilidade ao desenvolvimento de alterações macroscópicas na língua e palato;
- maior incidência de alterações microscópicas na língua e palato;

A partir disso, pode-se concluir que a ciclosporina A exacerbou o processo de carcinogênese bucal experimental em ratas.

## *Referências Bibliográficas*

### 3.1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN CM, SAFFER A; MEISTER R K et al. Comparison of a lesion-inducing isolate and a non-lesional isolate of *Candida albicans* in an immunosuppressed rat model of oral candidiasis. **J Oral Pathol Med** 1994; 23:133-9.
- ANNEROTH G; HANSEN LS, SILVERMAN S Jr, et al. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma: histologic grading in the clinical evaluation. **J Oral Pathol** 1986, 15: 162-8.
- ATKINSON K, BIGGS JC, BRITTON K. Distribution and persistence of cyclosporin in human tissues. **Lancet** 1982; 2:1165.
- BALLHAUS S, GREVERS G. Laryngeal cancer in immunosuppressive therapy with cyclosporin A. **Laryngol Rhinol Otol** 1988, 67: 369-72.
- BARTHELEMY H, FRAPPAZ A, CAMBAZARD F, et al. Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporine. **J Am Acad Dermatol** 1993; 18:1262-6.
- BECKER FF. Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. **Am J Pathol** 1981, 105: 3.
- BENCINI PL, MARCHESI L, CAINELLI T, et al. Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients treated with cyclosporin. **Brit J Dermatol** 1988, 118: 709-14.

- BERENBLUM I, SHUBIK P. A new qualitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **Br J Cancer** 1947, 1: 383-91.
- BILINNSKA-PIETRASZEK E, NAMYLOWSKI G, MROWKA-KATA K, et al. A case of neoplasm in a 15-years old patient treated with immunosuppressant for renal insufficiency. **Otolaryngol Pol** 2001, 55: 95-7.
- BIRKELAND SA. Cancers in transplanted patients - the Scandia-transplanted material. **Transplant Proc** 1983, 15:1071-8.
- BOREL JF, FEURER C, GUBLER HV. Biological effects of cyclosporin. A new antilymphocyte agent. **Agents and Action** 1976, 6: 468-75.
- BOREL JF. Cyclosporin. **Prog Allegry** 1986, 38:1-8.
- BOYD NM, READE PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. **J Oral Pathol** 1988, 17: 193-201.
- BRINKMEIER T, FROSCH PJ. Pyodermatites – pyostomatitis vegetans: a clinical course of two decades with response to cyclosporine and low-dose prednisolone. **Acta Derm Venereol** 2001, 81 (2): 134-6.
- BUEDING E, HAWKINS J, CHA YN. Antischistosomal effects of cyclosporin A. **Agents and Actions** 1981, 11:380-3.
- BUONPANE E. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. **Connecticut Medicine** 1990, 54: 17-9.
- BURNET E. Immunological surveillance in neoplasia **Transplant Rev** 1971, 7:3-7.
- BUTTON S, PALACIOS R. Cyclosporin A – usefulness, risks and mechanism of action. **Immunol Ver** 1982, 65: 5-9.
- CAIRNS J. The origin of human cancers. **Nature** 1981, 289: 353-7.

- CALNE RY, ROLLES DJG, WHITE S, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. **Lancet** 1972, 2:1033.
- CANAFAX D, ASCHER NL. Cyclosporin immunosuppression. **Clin Pharmacol** 1983, 2:512-24.
- CARP JM, ONUMA E, DAS K, et al. Intravenous cyclosporine therapy in the treatment of pyoderma gangrenosum secondary to Crohn's disease. **Cutis** 1997, 60: 135-8.
- CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. **Nature** 1992, 357:695-7.
- CORTES J, O'BRIEN S, LOSCERTALES J et al. Cyclosporin A for the treatment of cytopenia associated with chronic lymphocytic leukemia. **Cancer** 2001, 92 (8): 2016-22.
- COX MF, SCULLY C, MAITLAND N. Viruses in na aetiology of oral carcinoma, examination of incidence. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1991, 29:381-9.
- DALEY TD, WYSOCKY GP. Cyclosporin therapy **J Periodontol** 1984, 55(12): 708-12.
- DALEY TD, WYSOCKY GP, COLIN DHB. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine induced gingival hyperplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1986, 62 417-21.
- DELILERS GL, SANTORO F, POLLI N, et al. Light and electron microscopic study of cyclosporin A induced gingival hyperplasia **J Periodontol** 1986, 57: 771-5.

- ECDER ST, SEER MS, YILDIZ A, et al. Kaposi's sarcoma after renal transplantation in Turkey. **Clin Transplant** 1998, 12: 472-5.
- EISEN D, ELLIS CN, DUELL EA, et al. Effect of a topical cyclosporine rinse on oral lichen planus: a double-blind analysis. **N Engl J Med** 1990, 323: 290-4.
- EJSTRUT L. Severe dermatomyositis treated with cyclosporin A. **Ann Reum Dis** 1986, 45: 612-3.
- ELGART G, STOVER P, LARSON K, et al. Treatment of pyoderma gangrenosum with cyclosporine: results in seven patients. **J Am Acad Dermatol** 1991, 24:83-6.
- ELLIS CN, GORSULOWSKY DC, HAMILTON TA, et al. Cyclosporin improves psoriasis in a double-blind study. **JAMA** 1986, 256: 3110-6.
- EPSTEIN JB, REECE DE. Topical cyclosporin A for treatment of oral chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant** 1994, 13 (1): 81-6.
- FAIRLEY JW, HUNT BJ, GLOVER GW, et al. Unusual lymphoproliferative oropharyngeal lesions in heart and heart-lung transplant recipients. **J Laryngol Otol** 1990, 104:720-4.
- FEUTREN G, QUERIN S, TRON F, et al. The effects of cyclosporine in patients with systemic lupus. **Transplant Proc** 1986, 18: 643-4.
- FISKER AV. Experimental oral carcinogenesis: a basic model for the study of oral carcinogenesis using the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Danish Med Bull** 1990, 37: 433-43.

- FISKER AV, PHILIPSEN HP, OVERVAD K. Dose response relationship in complete oral 4NQO carcinogenesis in rats. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand** 1987, 95:281-8.
- FISKER AV, WEST MJ, PHILIPSEN HP, et al. Quantification of oral epithelial hiperplasia in rats after topical application of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. **Acta Odontol Scand** 1990, 48:125-31.
- FU E, HSIEHYD, NIEHS, et al. Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. **J Periodontol** 1999, 70: 189-194.
- FUJINO H, CHINO T, MAI T. Experimental production of labial and lingual carcinomas in hamsters by local application of 4-nitroquinoline n-oxide. **Nat Cancer Inst** 1965, 35: 907-18.
- FUJITA K, KAKU T, SDASAKI M, et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene. **J Dent Res** 1973, 52(2): 327-32.
- GIJTENBEEK JMM, VANDEN BENT MJ, VECHT CH. Cyclosporine neurotoxicity: a review. **J Neurol** 1999, 246: 339-46.
- GOULON M, ELKHARRAT D, GAJDOS P. Treatment of severe myasthenia gravis with cyclosporin. A 12-month open trial. **Presse Med** 1989, 18: 341-6.
- GREESPAN D, GREENSPAN JS, CONANT M, et al. Oral "hairy" leukoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpes-group virus. **Lancet** 1984, 2:831-4.

- GREESPAN D, GREENSPAN JS, DE SOUZA YG, et al. Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative renal transplant recipient. **J Oral Pathol Med** 1989, 18 32-4.
- GRIFFITHS CEM, POWLES AV, LEONARD JN, et al. Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. **Br Med J** 1986, 293: 1098-9.
- GROEN PC. Cyclosporine: a review and its specific use in liver transplantation. **Mayo Clin Proc** 1989, 64: 680-9.
- GUPTA S, KESHAVARZIAN A, HODGSON HJF. Cyclosporin in ulcerative colitis. **Lancet** 1984, 2:1277-8.
- HARDESTY RL, GRIFFITH BP, DEBSKI RF, et al. Experience with cyclosporine in cardiac transplantation. **Transplant Proc** 1983, 15: 2553-8.
- HARDIE IR, STRONG RW, et al. Skin cancer in caucasian renal allograft recipients living in a sub-tropical climate. **Surgery** 1980, 87:177-180.
- HARPENAU LA, PLEMONS JM, REES TD. Effectiveness of a low dose of cyclosporine in the management of patients with oral erosive lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1995, 80: 161-7.
- HARRIS JP, PENN I. Immunosuppression and the development of malignancies of the upper airway and related structures. **Laryngoscope** 1981, 91:520-8.
- HARWOOD AR, OSOBA D, HOFSTADER SL. Kaposi's sarcoma in recipients of renal transplants. **Am J Med** 1979, 67:759-65.
- HASSAN MMA, SHKLAR G, SOLT D, et al. Acute effect of DMBA application on mitotic activity of hamster buccal pouch epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1985, 59: 491-8.

- HERMAN M, WEINSTEIN T, KORZETS A, et al. Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. **J Lab Clin Med** 2001, 137: 14-20.
- HOJO M, MORIMOTO T, MALUCIO M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. **Nature** 1999, 397:530-4.
- HUGHES AP, JACKSON JM, CALLEN JP. Clinical features and treatment of peristomal pyoderma gangrenosum. **JAMA** 2000, 284: 1546-8.
- JACOBS C, BRUNNER FP, BRYNGER M, et al. Malignant diseases in patients treated by dialysis and transplantation in Europe. **Transplant Proc** 1981, 13:729-32.
- JAMES JÁ, IRWIN CR, LINDEN GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporin A transforming growth factor- $\beta$ 1. **J Periodont Res** 1998, 33:40-8.
- JENSEN JR, THESTRUP-PEDERSEN K, ZACHARIAE H, et al. Cyclosporin A therapy for mycosis fungoides. **Arch Derm** 1987, 123: 160-3.
- JOHN GT, VINCENT L, JEYASEELAN L, et al. Cyclosporine immunosuppression and mycobacterial infections. **Transplant** 1994, 58: 247-9.
- JOHNSON FE, AWAD EM, DOERR DE, et al. Effect of cyclosporine on carcinogenesis induced in rats by n-methyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine. **J Surg Res** 1984, 37: 180.
- KAHAN BD. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. **Transpl Proc** 1989, 21: 1725-38.

- KAI T, TAKETAZU F, KAWAKAMI M, et al. Distribution of transforming growth factor- $\beta$  and receptors in gastric carcinoma tissue. **Jpn J Cancer Res** 1996, 87:296-304.
- KAMHOLZ SL, VEITH FJ, MONTEFUSCO CM, et al. Single lung transplantation with cyclosporine immunosuppression. **Transplant Proc** 1983, 15: 2578.
- KEMME DJ, BUNN PA Jr. State of the art therapy of mycosis fungoides and Sezary syndrome. **Oncology** (Hunting) 1992, 6 (8): 41-42.
- KENOW J, WIEDEMANN G. Transforming growth factor- $\beta$ : a cytokine with multiple actions in oncology and potential clinical applications. **Int J Oncol** 1995, 7:177-82.
- KING GN, HEALY CM, GLOVER MT, et al. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1994, 78:718-26.
- KINLEN LJ, SHEIL AGR, PETOJ, et al. Collaborative United Kingdom-Australian study of cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. **Br Med J**. 1979, 2:1461-6.
- KITANO M, HATANO H, SHISA H. Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide induced tongue carcinoma in rats. **Jpn J Cancer Res** 1992, 83: 843-80.

- KOO JY, KADONAGA JN, WINTROUB BV, et al. The development of B-cell lymphoma in a patient with psoriasis treated with cyclosporine. **J Am Acad Dermatol** 1992, 26: 836-40.
- KRUPP P, MONKA C. Side-effect profile of cyclosporin A in patients treated for psoriasis. **Br J Dermatol** 1990, 122:47-56.
- KUTUZOV H, SICHER H. The filiform and conical papillas of the tongue in the white rat. **Anat Rec** 1951, 110: 275-88.
- LEKHOLM U, WALLENIUS K. Experimental oral cancer in rats with xerostomia. **Odont Revy** 1976, 27: 11-8.
- MARKS JM. Cyclosporin A treatment of severe psoriasis. **Br J Dermatol** 1986, 115: 749-754.
- MATHIESON PW. Cyclosporin: nephro-protective as well as nephrotoxic? **Clinical and Experimental Immunology** 2000, 121 (2): 179-80.
- MATTHEWS JB, MASON GI, SCULLY CM et al. "In situ" characterisation of the oral mucosa inflammatory cell response of rats induced by 4-nitroquinoline-N-oxide. **Carcinogenesis** 1986, 7: 786-8.
- MERTIN J, KNIGHT SC, RUDGE P, et al. Double blind controlled trial of immunosuppression in treatment of multiple sclerosis. **Lancet** 2: 949-51; 1980.
- MILAHOV M, GATTUSO P, ABRAHAM K, et al. Incidence of post-transplant malignancy among 674 solid-organ-transplant recipients at a single center. **Clin Transplant** 1996, 10: 248-255.

- MIN DI, MONACO AP. Complications associated with immunosuppressive therapy and their management. **Pharmacotherapy** 1991, 11: 119-125.
- MOLCEPERES J, CHACÓN M, GUZMÁN M et al. Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. **International Journal of Pharmaceutics** 2000, 197:129-41.
- MORRIS PJ. The impact of cyclosporin A. **Transplant** 1981, 32: 349-54.
- MULLER W, HERRMANN B. Cyclosporin A for psoriasis **New Engl J Med** 1979, 301:555.
- MURAYAMA T, IMOTO S, TAKAHASHI T et al. Successful treatment of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia with cyclosporin A. **Cancer** 1992, 69 (10): 2567-70.
- MYERS BD. Cyclosporine nephrotoxicity **Kidney Int** 1986, 30: 964.
- MYOKEN Y, MYOKEN Y, OKAMOTO T, et al. Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF1), FGF-2, and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumors. **J Pathol** 1996, 178: 429-36.
- MYRILLAS TT, LINDEN GJ, MARLEY JJ, et al. Cyclosporin A regulates interleukin-12 and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. **J Periodontol** 1999, 70: 294-300.
- NAGAO M, SUGIMURA T, Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Adv Cancer Res** 1976, 23: 131-67.

- NAKAHARA W, FUKUOKA F, SUGIMURA T. Carcinogenic actions of 4-nitroquinoline N-oxide. **GAAN**, 1957, 48:129-37.
- NALESNIK MA, JAFFE R, STARZL TE, et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A – prednisone immunosuppression. **Am J Pathol** 1988, 133: 173-92.
- NAMYSLOWSKI G, RELIGA Z, STESZEWSKA U, et al. A case of laryngeal carcinoma as a result of immunosuppressive therapy with cyclosporin A following heart transplantation. **Otolaryngol Pol** 1994, 48: 72-4.
- NAUTA JM, ROODENBURG JLN, NIKKELS PGJ, et al. Comparison of epithelial dysplasia – the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1995, 24: 53-8.
- NAVARRO CM. Efeitos da sialoadenectomia na carcinogênese bucal de ratos provocada pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). Piracicaba - SP, 1992 (Tese de Mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.
- NIEH S, FU E, HSIEH YD, et al. Effects of cyclosporin A on the mandibular condylar cartilage in rats. **Arch Oral Biology** 1999, 44: 693-700.
- NUSSEMBLATT RB, PALESTINE AG, CHAN C, et al. Effectiveness of cyclosporine therapy for Behçet's disease. **Arthritis Rheum** 1985, 28: 671-9.
- OCHIAI E, SEI SJ. **J Pharmac Soc Japan**. 1945, 65: 18. In: NAKAHARA W, FUKUOKA F, SUGIMURA T. Carcinogenic actions of 4-nitroquinoline N-oxide. **GAAN**, 1957, 48:129-37.
- ODOM RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. **J Am Acad Dermatol** 1994, 31:556-9.

- OLIVARI MT, DIEKMAN RA, KABO SH, et al. Low incidence of neoplasia in heart and heart-lung transplant recipients receiving triple-drug immunosuppression. **J Heart Transplant** 1990, 9: 618-621.
- PAGE EH, WEXLER DM, GUENTHER LC. Cyclosporin A. **J Am Acad Dermatol** 1986, 14: 785-91.
- PALESTINE AG, NUSSEMBLATT RB, CHAN C. Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation. **Am J Med** 1984, 77: 652-6.
- PAN WL, CHAN CP, HUANG CC, et al. Primary extramedullary plasmocitoma in cyclosporine induced gingival overgrowth. A case report. **J Periodont**. 1995, 66: 804-7.
- PARODI A, REBORA A. Topical cyclosporine in alopecia areata. **Arch Dermatol** 1987, 123: 165-6.
- PENN I, HAMMOND W, BRETTSCHEIDER L, et al. Malignant lymphoma in transplantation patients. **Transplant Proc** 1969, 9: 106-112.
- PENN I. Immunosuppression and skin cancer. **Clin Plast Surg** 1980, 7: 361-8.
- PENN I. Cancers following cyclosporin therapy. **Transplant** 1987, 43:32-5.
- PENN I, BRUNSON ME. Cancers after cyclosporine therapy. **Transplant Proc** 1988, 20: 885-92.
- PENN I. Cancers in cyclosporine-treated vs azathioprine-treated patients. **Transplant Proc** 1996, 28: 876-8.

- PERERA MIR, KUNZ HW, GILL TJ, et al Enhancement of induction of intestinal adenocarcinomas by cyclosporine in rats given a single dose of n-metyl-n-nitrosourea. **Transplantation** 1986, 42: 297.
- POWLES RL, CLINK HM, SPENCE D, et al. Cyclosporine A to prevent graft-vs-host-disease in man after bone marrow transplantation. **Lancet** 1980, 1: 327-9.
- PRIME SS, MALAMOS D, ROSSER T, et al. Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. **J Oral Pathol** 1986, 15: 280-3.
- QUNIBI WY, AKMTAR M, GIMN E, et al. Kaposi's sarcoma in cyclosporin-induced gingival hyperplasia. **Am J Kidney Dis** 1988, 11: 349-52.
- REBUCK AS, ATILLER CR, BRAUDE AC, et al. Cyclosporin for pulmonary sarcoidosis. **Lancet** 1984, 1:1174.
- REDDI AS, JYOTHIRMAYI GN, HALKA K, et al. Potentiation of renal tumorigenicity by cyclosporine A in streptozotocin dibetic rats. **Cancer Lett** 1991, 56: 109.
- REGEV E, ZELTER R, LUSTMAN J. Lip carcinoma in renal allograft recipient with long-term immunossuppressive therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1992, 73: 412-4.
- RICH AM, READE PC. Histomorphometric analysis of epithelial changes in chemically induced oral mucosal carcinogenesis in rats. **J Oral Pathol** 1988, 17: 528-33.

- RINALDI M, PELLEGRINI C, D'ARMINI AM, et al. Neoplastic disease after heart transplantation: single center experience. **European J Cardio thoracic Surg** 2001, 19 696-701.
- ROSS PJ, NAZIF MM, ZULLOT F, et al. Effects of cyclosporin A on gingival status following liver transplantation. **J Dent Children** 1989, 1: 56-9.
- RYFFEL B, DONATSCH P, MADÖRIN M. Toxicological evaluation of cyclosporin A. **Arch Toxicol** 1983, 53: 107-41.
- RYFFEL B. The carcinogenicity of ciclosporin **Toxicol** 1992, 73:1-22.
- SAITO K. Expression of p53 protein and Ki67 antigen in gingival hyperplasia induced by Nifedipine and Phenytoin. **J Periodontol** 1999, 70:581-6.
- SALLEY JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. **J Dent Res** 1954, 33(2): 253-62.
- SANGALLI L, BORTOLOTTI A, JIRITANO L, et al. Cyclosporine pharmacokinetics in rats and interspecies comparison in dogs, rabbits, rats and humans. **Drug Metabol Disposition** 1988, 16: 749-53.
- SANTOS EB. Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato. Piracicaba - SP, 1999 (Tese de Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.
- SEIBEL W, YAHIA NA, MCCLEARY LB, et al. Cyclosporine induced gingival overgrowth in beagle dogs. **J Oral Pathol Med** 1989, 18: 240-5.
- SEYMOUR RA, THOMASON JM, NOLAN A. Oral lesions in organ transplant patients. **J Oral Pathol Med** 1997, 26:297-304.

- SHIONG YS, LIAN JD, LIN CY, et al. Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma of the maxillary sinus in a renal transplant recipient. **Transplant Proc** 1992, 24:1929-31.
- SIEGAL B, LIVINTON-KRISS S, SCHIFFER A, et al. Kaposi's sarcoma in immunosuppression. **Cancer** 1990, 65:492-8.
- SMITH CJ, PINDBORG JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. 1969, Copenhagen: C. Hamburger.
- SPOLIDORIO LC, MERZEL J, VILLALBA H, et al. Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. **J Periodont Res** 2001, 36: 384-9.
- SPRATT H, BOOMER S, IRWIN CR, et al. Cyclosporin associated gingival overgrowth in renal transplant recipients. **Oral Diseases** 1999, 5: 27-31.
- STARZL TE, IWATSUKI S, VAN THIEL DH, et al. Evolution of liver transplantation. **Hepatology** 1982, 2: 614.
- STARZL TE, NALENSKI MA, PORTER KA, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. **Lancet** 1984, 1: 583.
- STEIDLER NE, READE PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1-oxide **Oral Surg Oral Pathol Oral Med** 1984, 57: 524-31.
- STILLER CR, LAUPACIS A, KENOW PA, et al. Cyclosporine: Action, pharmacokinetics and effect in the BB rat model. **Metabolism** 1983, 32: 69-72.

- SUGANO N, ITO K, MURAI S. Cyclosporin A inhibits collagenase gene expression via AP-1 and JNK suppression in human gingival fibroblasts **J Periodontol Res** 1998, 33: 448-52.
- SUGIMURA T, OKABE K, ENDO H. The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide by rat liver enzymes. **GANN** 1965, 65: 489-501.
- SVENSSON S, HEYDEN G. Experimental induction of irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. **Int J Oral Surg** 1982, 11 52-8.
- TANAKA T, KOJIMA T, KAWAMORI T, et al. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. **Cancer** 1995, 75: 1433-9.
- TANAKA T, KUNIYASU T, SHIMA H, et al. Carcinogenicity of betel quid. III. Enhancement of 4-nitroquinoline 1-oxide and N-2-fluorenylacetamide-induced carcinogenesis in rats by subsequent administration of betel nut. **JCLN** 1986, 7: 777-81.
- TANAKA T, TAKEUCHI T, HARA A, et al. Computer-assisted image analyses of silver positive nucleolar organizer regions in preneoplastic and neoplastic lesions of the liver and urinary bladder induced by carcinogens in rats. **Igaku-no-Ayumi** 1990, 154: 81-2.
- THE CANADIAN MULTICENTRE TRANSPLANT STUDY GROUP. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation : analysis at three years. **N Engl J Med** 1986, 314: 1219-25.
- THIVOLET J, BARTHELEMY H, RIGOT-MULLER G, et al. Effects of cyclosporine on bullous pemphigoid and pemphigus. **Lancet** 1985, 1: 334-5.

- THOMAS DW, SEDDON SV, SHEPHERD JP. Systemic immunosuppression and oral malignancy: a report case of review of literature. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1993, 31:391-3.
- THOMMEN SK. Antimalarial activity of cyclosporin A. **Agents and Action** 1981, 11: 770-3.
- VAN DER WAAL I, SCHEPMAN KP, VAN DER MEIJ LE, et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncology** 1997, 33: 291-301.
- VAN JOOST TH, STOLZ E, HUELE F. Efficacy of low dose cyclosporine in severe atopic skin disease. **Arch Dermatol** 1987, 123: 166-7.
- VARGA E, TYLDESLEY WR. Carcinoma arising in cyclosporin-induced gingival hyperplasia. **Br Dent J** 1991, 171:26-7.
- VOLPE A, DOMINGUES MG, et al. Hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina: estudo clínico e histopatológico. **RPG** 1997, 4(2): 133-140.
- VON GRAFFENRIED B, KRUPP P. Side effects of cyclosporine (Sandimmun) in renal transplant recipients and in patients with autoimmune disease. **Transplant Proc** 1986, 18: 876-83.
- WALLENIUS K. Experimental oral cancer in the rat with special reference to the influence of saliva. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1966, supl. 180.
- WALLENIUS K, LEKHOLM U. Oral cancer in rats induced by water-or-fat-soluble carcinogens. **Odont. Revy** 1973, 24:115-26.
- WALLENIUS K, LEKHOLM U. Influence of the saliva on epidermal cancer in rats induced by the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. **Odont. Revy** 1976, 24:39-48.

- WASSEF R, COHEN Z, LAUGER B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats - influence of route of administration and dosage. **Transplant** 1985, 40(5): 483-93.
- WIERNIK PH, DUTCHER JP, LEAF AN, et al. Objective response of multiple myeloma to cyclosporin A. **Leuk Lymph** 1994, 16: 167-70.
- WILKINSON AH, SMITH JL, HUNSICKER LG, et al. Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine and prednisone. **Transplant** 1989, 47: 293-6.
- WONG PCN, WILSON DF. 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in the rat palate. **J Oral Maxillofac Surg** 1983, 12: 375-84.
- WRIGHT JÁ, HUNG A. Growth factors in mechanisms of malignancy: roles for TGF- $\beta$  and FGF. **Histol Histopathol** 1996, 11:521-36.
- YAMADA T, MOGI M, KAGE T, et al. Enhancement by cyclosporin A of metastasis from hamster cheek pouch carcinoma. **Archs Oral Biol** 1992, 37:593-6.
- YAMAMOTO T, KATAYAMA I, NISHIOKA K. Adenocarcinoma of the mouth in a patient with psoriasis under short-term cyclosporine therapy. **Dermatol** 1996, 193: 72-3.
- YING TS, ENOMOTO K, SARMA DSR, et al. Effects of delays in the cell cycle on the induction of preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver by 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Res** 1982, 876-80.