

CLÁUDIA MARIA NAVARRO

EFEITOS DA SIALOADENECTOMIA NA
CARCINOGENESE BUCAL DE RATOS
PROVOCADA PELO ÓXIDO DE
NITROQUINOLINA (4NQO)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Bucal (Área de Patologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA - S.P.

- 1992 -

N228e

18509/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLAUDIA MARIA NAVARRO

EFEITOS DA SIALOADENECTOMIA NA
CARCINOGENESE BUCAL DE RATOS
PROVOCADA PELO ÓXIDO DE
NITROQUINOLINA (4NQO)

*Esta exemplar
foi devidamente
corrigido conforme
resolução CCB/036/83
18/12/92
Almeida*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Bucal (Área de Patologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

PIRACICABA - S.P.

- 1992 -

Este trabalho é dedicado a

meus pais,

ADILSON e DALVA

Ao Prof. Dr. **OSLEI PAES DE ALMEIDA** pelo exemplo diário de dedicação profissional, e por ter orientado este trabalho com seriedade, segurança e entusiasmo.

À Profa. Dra. MIRIAN APARECIDA ONOFRE,
pelo estímulo e exemplo recebidos desde
o Curso de Graduação.

AGRADECIMENTOS

- Aos companheiros da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela amizade e paciência a mim dedicadas, tornando mais ameno o caminho até aqui percorrido.
- Aos professores, alunos e amigos do Curso de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado) em Biologia e Patologia Buco Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
- Aos amigos ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE e MARILDA APARECIDA GONÇALVES TOTTI, pelo inestimável auxílio durante a execução da fase experimental deste trabalho.
- Ao amigo e aluno do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco Dental, PEDRO DUARTE NOVAES, pela colaboração recebida principalmente durante a documentação fotográfica.
- À Srta. FABIANA FACCO CASAROTTI, pela obtenção dos cortes em parafina.
- À Sra. MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON, pelo respaldo técnico fornecido durante o processamento laboratorial das peças utilizadas neste trabalho.

- À Profa. TEREZA DE LOURDES S. BARRICHELLO e Prof. Dr. MATHIAS VITTI ex-coordenadores, e ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING, atual coordenador do Curso de Biologia e Patologia Buco Dental.
- Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.
- Às Profas. da Disciplina de Semiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela compreensão e apoio, tornando possível nosso afastamento para o desenvolvimento deste trabalho.
- A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	2
PROPOSIÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	92
RESUMO	93
SUMMARY	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A xerostomia favorece a instalação de processos infecciosos na boca, mas a relevância com relação ao câncer bucal no homem ainda não está estabelecida. Experimentalmente a redução do fluxo salivar pode ser obtida pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores ou pelo uso de parasimpatomiméticos, como a metil-escopolamina. A sialoadenectomia provoca xerostomia severa e permanente, mantendo a secreção das glândulas salivares menores. A metil-escopolamina, usada em intervalos de 48 horas, provoca redução do fluxo salivar total nas primeiras 8 horas, e nas outras 40 o fluxo é normal. **WALLENIUS** (1966) estudou extensivamente os efeitos da xerostomia em ratos, mostrando que o tempo para o desenvolvimento do câncer bucal causado pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é reduzido mais intensamente pela metil-escopolamina do que pela sialoadenectomia. Como o DMBA é lipossolúvel, **WALLENIUS & LEKHOLM** (1973) introduziram o uso do óxido de nitroquinolina (4NQO), que é hidrossolúvel e que provoca carcinomas de palato e língua de ratos, morfológicamente semelhantes aos humanos. A inibição da secreção salivar pela metil-escopolamina facilita a carcinogênese pelo 4NQO, mas não há estudos em ratos sialoadenectomizados. Portanto, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos da remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores em ratos tratados com 4NQO durante 1, 2, 3 e 6 meses.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 - CÂNCER BUCAL

O câncer bucal está entre as dez neoplasias mais comuns do homem, tendo sido diagnosticados no ano de 1980, 378.500 novos casos no mundo (BOYLE e cols., 1990). As maiores incidências ocorrem na Índia, Paquistão e Sri-Lanka. No Sudeste da Ásia o câncer de boca representa 40 a 50% das neoplasias malignas, enquanto que em países ocidentais varia de 3 a 5% (WYNDER e cols., 1957; PINDBORG, 1980). É relativamente comum em algumas regiões da França e, no Brasil de acordo com o último levantamento oficial realizado, a incidência é de 14% (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1991).

Os carcinomas de células escamosas representam 90% a 95% das neoplasias malignas de boca, sendo mais frequentes em indivíduos do sexo masculino com idade acima de 40 anos, podendo ocorrer eventualmente em indivíduos com menos de 30 anos (DREIZEN & LEVY, 1982; SANKARANARAYANAN e cols., 1989). Os locais mais atingidos são o lábio inferior e a língua. De acordo com estudos realizados por FRANCO e cols. (1989), em regiões metropolitanas do Brasil, o câncer de língua é o mais frequente na boca, estando associado ao consumo de álcool, principalmente na forma de cachaca.

O câncer de lábio inferior é cerca de vinte vezes mais frequente do que no superior, tendo comportamento biológico e etiologia diferentes dos carcinomas intrabucais (BOYLE e cols., 1990). É muito raro em negros, ocorrendo predominantemente em indivíduos da zona rural devido à exposição intensa aos raios solares (SPITZER e cols., 1975; DREIZEN & LEVY, 1981).

Os carcinomas espinocelulares de boca podem se apresentar sob a forma de ulceração, assumindo aspectos clínicos variados de acordo com a localização, como: regiões avermelhadas entremeadas por áreas esbranquiçadas; úlceras incipientes de leito necrótico com bordas elevadas, endurecidas e mal delimitadas; úlceras de leito exofítico e, carcinomas de aspecto verrucoso comuns principalmente na mucosa retrocomissural. A maioria das lesões iniciais são assintomáticas, exceto nos casos em que estejam infectadas secundariamente. Metástases regionais em linfonodos cervicais ocorrem, principalmente nos carcinomas de borda lateral da língua devido à rica drenagem linfática. Na língua, a lesão geralmente apresenta-se como massa tecidual exofítica de base ampla e endurecida à palpação, com superfície irregular e ulcerada.

No lábio, o aspecto clínico do carcinoma depende da duração da lesão e do tipo do crescimento neoplásico. Usualmente o carcinoma origina-se na semimucosa labial de um dos lados da linha média, iniciando como pequena área de espessamento epitelial, endurecimento e ulceração superficial. À medida em que a lesão progride, forma-se pequena depressão superficial ou crescimento tecidual proliferativo de caráter exofítico. O carcinoma de lábio raramente provoca.

O carcinoma de células escamosas é formado de ninhos, cordões ou grupos de células epiteliais malignas que infiltram o tecido conjuntivo subjacente. As células tumorais possuem morfologia de algumas ou de todas as camadas do epitélio pavimentoso estratificado, exibindo hipercromatismo, pleomorfismo e mitoses atípicas. Como as células de origem, têm forma poliédrica e pontes intercelulares; mas podem ser menos diferenciadas, dificultando a identificação da célula como elemento epitelial. Considera-se que, quanto menos diferenciada for histologicamente a lesão, mais pobre o prognóstico, mas isto não é aceito por todos os autores. A ocorrência de metástases regionais é comum e depende de fatores como o grau de diferenciação, localização e estadiamento clínico da lesão.

O grau de diferenciação dos carcinomas é estimado pela formação de queratina pelas células neoplásicas, que podem inclusive originar massas denominadas pérolas córneas. Nos casos em que há produção exuberante de queratina na forma de pérolas córneas, o carcinoma é considerado bem diferenciado.

1.1 - ETIOLOGIA

O fumo e o álcool são as principais causas do carcinoma de boca, ambos atuando como carcinógenos químicos (WEAVER e cols., 1979; PINDBORG, 1980; BOYD & READE, 1988).

A carcinogênese química envolve longo período de exposição a um ou mais carcinógenos, e de acordo com ROUSE & KIDD (1941)

ocorre em dois estágios, iniciação e promoção (BERENBLUM & SHUBIK; 1947). Na iniciação as células normais seriam convertidas em neoplásicas, permanecendo latentes até serem estimuladas pelos agentes promotores. A iniciação requer um carcinógeno químico como o DMBA ou 4NQO, enquanto que a promoção pode se dar através de irritantes locais inespecíficos. Existe a hipótese de que no homem, o fumo atue como agente iniciador e o álcool como promotor do câncer de boca (STEIDLER & READE, 1986; BOYD & READE, 1988).

A promoção dos carcinomas de ocorre quando grandes volumes de substâncias irritantes, como o óleo de algodão e a terpentina, são aplicados por longo período (BOYD & READE, 1988). As células que sofreram iniciação prévia, proliferam localmente, tornando o processo irreversível (FARBER & CAMERON, 1980; FARBER, 1980; BECKER, 1981; YING e cols., 1982).

A fase de iniciação envolve alterações permanentes no DNA. Alguns autores como BOUCK & DIMAYORCA (1976) e SUKUMAR e cols. (1983), consideram que há um ponto específico da molécula onde a mutação ocorre, enquanto outros como CAIRNS (1981), acreditam que haja ampla escala de alterações genéticas como transposições, rearranjos e deleções.

Estudos epidemiológicos, especialmente no Sudeste da Ásia e no Brasil, têm demonstrado de maneira convincente, a correlação entre o uso do tabaco e a frequência de carcinomas bucais (DREIZEN & LEVY, 1981; FRANCO e cols., 1989; SANKARANARAYANAN e cols., 1989). O hábito de fumar com a extremidade acesa do cigarro no interior da boca, de mascar fumo e de usar rapé são comumente associados ao desenvolvimento de carcinomas de células escamosas (PINDBORG, 1980;

SANKARANARAYANAN e cols., 1989).

Em Porto Rico, MARTÍNEZ (1969) estabeleceu que o risco de indivíduos fumantes desenvolverem câncer bucal é duas e meia a cinco vezes mais elevado em relação a não fumantes. O hábito de fumar, combinado ao de mascar tabaco aumenta o risco em 23 vezes para homens e em 35 vezes para mulheres, sendo que o hábito de fumar cachimbo é mais grave em relação ao de fumar cigarros (JAFAREY & ZAIDI, 1976; BOYLE e cols., 1990).

Estudos realizados no Brasil entre fumantes e não fumantes, revelaram que o risco de desenvolvimento de câncer para fumantes de cigarro é de 6,3, cachimbo 14,0 e cigarro de palha 7,0 (FRANCO e cols., 1989). Os mesmos autores encontraram forte correlação entre o número de cigarros consumidos por ano e o desenvolvimento de câncer de boca; constatando ainda, que o risco entre ex-fumantes de cigarro se tornava semelhante ao dos não fumantes dez anos após terem abandonado o hábito. Portanto a redução dos riscos é fator importante na prevenção do câncer bucal (BOYLE e cols., 1990).

A associação entre álcool e câncer bucal é citada desde 1957, sendo que nos Estados Unidos da América, WYNDER e cols. (1957) e GRAHAN e cols. (1977) verificaram que em alcoólatras que ingeriam mais de 6 doses diárias de uísque ou de outras bebidas de elevado teor alcoólico, o risco para desenvolver câncer bucal era dez vezes maior em relação a indivíduos que não bebiam (WYNDER e cols., 1957; GRAHAN e cols., 1977). A ingestão de vinho e de bebidas como a cachaca, é fortemente associada ao aparecimento de câncer de língua. Além disso, bebidas não alcoólicas como o chimarrão estão

relacionadas com o câncer, por serem ingeridas a temperaturas elevadas (FRANCO e cols., 1989).

Na França é elevado o índice de mortalidade para câncer de boca, faringe e laringe, sendo maior do que para o câncer broncopulmonar em pacientes do sexo masculino com menos de 55 anos de idade. Tal fato ocorre porque dois terços das famílias francesas consomem álcool diariamente como hábito social (BRUGERE e cols., 1986). Além disso, o potencial mutagênico do licor de maçã consumido amplamente na França, sugere grandes riscos para o desenvolvimento de câncer de esôfago (LOQUET e cols., 1981).

O álcool também pode levar à cirrose hepática, existindo correlação entre a cirrose e a incidência de câncer de boca (KELLER, 1969; PINDBORG, 1980). A cirrose pode causar carências vitamínicas em decorrência de distúrbios metabólicos, sendo possivelmente importante na carcinogênese, visto que nos estudos de VINCENT e cols. (1964), de 106 pacientes com câncer bucal, 45% apresentaram problemas hepáticos e, de 144 autópsias realizadas em pessoas que morreram devido ao câncer de boca, 28% revelaram a presença de cirrose hepática.

Usualmente, os indivíduos que bebem também fumam, e há sinergismo entre estes dois fatores etiológicos (ROTHMAN & KELLER, 1972; BROSS & COOMBS, 1976; BRUGERE e cols., 1986; BLOT e cols., 1988; MERLETTI e cols., 1989). A associação do tabaco com o álcool eleva significativamente a probabilidade de desenvolvimento do câncer de boca (HIRAYAMA, 1966; WEAVER e cols., 1979; BOYLE e cols., 1990). Além disso, a dose, a frequência e a duração da exposição ao álcool e tabaco devem ser consideradas (FREEDMAN & SHKLAR, 1978). Calcula-

se que o fumo associado ao álcool seja responsável por aproximadamente 75% de todos os casos de câncer de boca nos Estados Unidos da América (BOYLE e cols., 1990).

Além do álcool e tabaco, soluções usadas para bochecho também podem ser importantes na etiologia do câncer bucal (BLOT e cols., 1983; WYNDER e cols., 1983; KABAT e cols., 1989; BOYLE e cols., 1990). Segundo WEAVER e cols. (1979), diversas soluções para bochecho apresentam teor alcoólico entre 14 e 28%, valores estes que igualam ou excedem àqueles encontrados nas bebidas alcoólicas. Além disso, as soluções utilizadas para bochecho geralmente permanecem mais tempo em contato com as mucosas bucais do que as bebidas. De acordo com os mesmos autores, de cem pacientes com câncer de boca, onze não faziam uso de tabaco e nem ingeriam bebidas alcoólicas, porém usavam soluções para bochecho no mínimo duas vezes ao dia durante pelo menos vinte anos seguidos.

A radiação solar é considerada um dos principais fatores etiológicos do câncer de lábio. Pescadores que moram em ilhas americanas têm probabilidade quatro vezes e meia maior para desenvolver câncer de lábio em relação aos demais moradores da mesma região (SPITZER e cols., 1975; PINDBORG, 1980).

Segundo BOYDE & READE (1988), o carcinoma bucal pode sofrer influência da dieta; assim, o excesso ou a deficiência de vitamina podem afetar o metabolismo e a ativação específica dos carcinógenos. A vitamina C, por exemplo é capaz de inibir a nitrosilação de aminas secundárias, evitando conseqüentemente a formação de nitrosaminas. Por outro lado, redução significativa no risco de câncer foi associada ao consumo frequente de frutas

cítricas e de alimentos ricos em caroteno como a cenoura, abóbora e mamão (WINN e cols.,1984; McLAUGHLIN e cols.,1988; FRANCO e cols.,1989; ROSSING e cols.,1989; BOYLE e cols.,1990; STICH e cols.,1991).

Em 1962 nos Estados Unidos da América, verificou-se que em trabalhadores de indústrias têxteis o câncer bucal era três vezes mais comum que o câncer de outras regiões (VOGLER e cols., 1962). Na Inglaterra as constatações foram semelhantes, sendo que por razões desconhecidas, trabalhadores de indústrias têxteis de algodão parecem estar mais sujeitos a desenvolver carcinomas de boca (BINNIE e cols., 1972; MOSS & LEE, 1974).

O papel da higiene dental precária, restaurações inadequadas, arestas dentais e próteses totais mal adaptadas na etiologia do câncer de boca ainda é inconclusivo (PINDBORG, 1980; FRANCO e cols., 1989).

2 - CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

A incidência de tumores espontâneos em animais é baixa, aproximadamente 10% para cães, 0,5% para gatos e 2% para cavalos (DREIZEN & LEVY, 1981). Em 1925, BONNE observou que aplicações de alcatrão na pele de camundongos provocava papilomas na boca e no estômago, provavelmente em decorrência do hábito de lamber a região, sendo portando, um dos primeiros autores a propor que o tabaco

poderia ser utilizado na carcinogênese experimental.

Os primeiros pesquisadores de carcinogênese intrabucal utilizaram como carcinógeno o tabaco ou produtos de sua combustão (BONNE, 1925; ROFFO, 1930; OYAMA, 1935; KRESHOVER, 1952). Posteriormente, outras substâncias como hidróxido de cálcio, também foram usadas (DUNHAM e cols., 1966; COHEN, 1971). Desde a produção de câncer de pele na orelha de coelhos mediante o uso de alcatrão, aproximadamente 1.300 compostos foram estudados quanto às suas propriedades carcinogênicas (SALLEY, 1954).

O primeiro modelo experimental de câncer bucal que forneceu bons resultados foi introduzido por SALLEY em 1954, através da aplicação do hidrocarboneto policíclico 9,10 dimetil-1,2 benzantraceno (DMBA), na bolsa da bochecha de hamsters. Este modelo continua sendo utilizado por vários autores (MAREFAT e cols., 1979; ODUKOYA & SHKLAR, 1984; HASSAN e cols., 1985; MAEDA & KAMEYAMA, 1986; LIN e cols., 1989; FISHER e cols., 1990). Entretanto, o DMBA é pouco efetivo quando aplicado na mucosa bucal de outros animais. WALLENIS & LEKHOLM (1973), introduziram o uso do óxido de nitroquinolina (4NQO), que ao contrário do DMBA é hidrossolúvel e quando aplicado no palato de ratos, provoca carcinomas de palato e de dorso de língua. Atualmente é o modelo mais empregado no estudo da carcinogênese bucal (MATTHEWS e cols., 1988; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1988; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1989; LUKER e cols., 1989; FISHER e cols., 1990).

2.1 - 9,10 DIMETIL-1,2 BENZANTRACENO (DMBA)

O primeiro modelo de carcinogênese bucal que deu bons resultados, do o introduzido por SALLEY em 1954 através da aplicação de DMBA na bolsa da bochecha de hamsters.

O DMBA é hidrocarboneto aromático policíclico que após dissolução em acetona ou benzeno é aplicado na bolsa de hamster três vezes por semana, durante dezesseis semanas. O epitélio sofre alterações progressivas como hiperplasia, papiloma, carcinoma "in situ" e carcinoma de células escamosas. Os primeiros carcinomas são observados após sete semanas de tratamento.

SHKLAR (1965), utilizou aplicações de DMBA a 0,5% em propilenoglicol na bochecha de hamster três vezes por semana, e os carcinomas desenvolveram-se após oito semanas. Na análise enzimática em cortes por congelação, verificou-se que nas células neoplásicas a atividade da desidrogenase láctica estava aumentada, e da desidrogenase succínica diminuída, sugerindo que o metabolismo destas células estava modificado, passando da respiração para a fermentação, o que pode ser considerado mutação.

Os efeitos do DMBA e do tabaco em contato prolongado com a mucosa de macacos foram avaliados por COHEN & SMITH (1967). O DMBA foi pincelado na mucosa jugal dos animais, e o tabaco inserido numa bolsa artificial da bochecha preparada cirurgicamente. Alterações mais severas ocorreram no grupo tratado com tabaco, ocorrendo vacuolizações celulares e hiperplasia epitelial. Não observou-se atipias celulares após quatorze meses de experimento, concluindo-se

que os macacos são mais resistentes ao DMBA que o hamster; e mais sensíveis à ação do tabaco em relação ao DMBA.

Através do modelo desenvolvido por SALLEY (1954), FREEDMAN & SHKLAR (1978) estudaram os efeitos do DMBA a 0,5% em óleo mineral, associado ao consumo de álcool a 10% em água. O DMBA foi pincelado na bolsa da bochecha esquerda de hamsters 3 vezes por semana, durante o período máximo de quatorze semanas. O grupo que recebeu carcinógeno e ingeriu álcool desenvolveu displasia epitelial e carcinomas de células escamosas mais precocemente em relação ao grupo que foi tratado apenas com carcinógeno.

Baseados nos estudos de BERENBLUM & SHUBIK (1947), ODUKOYA & SHKLAR (1984), avaliaram o DMBA como agente iniciador e do peróxido de benzoíla como promotor da carcinogênese intrabucal de hamsters. O DMBA a 0,1% em propilenoglicol, foi aplicado na bolsa da bochecha tres vezes por semana, durante dez semanas. Os animais foram divididos em seis grupos: o primeiro recebeu aplicações de DMBA; o segundo DMBA seguido de peróxido de benzoíla a 40%; o terceiro DMBA e aplicações de acetona; o quarto foi tratado com peróxido de benzoíla; o quinto com acetona e o sexto foi utilizado como controle. Após 25 semanas, todos os animais que receberam DMBA e peróxido de benzoíla, desenvolveram câncer, sendo as lesões mais severas e numerosas em relação aos outros grupos.

Usando DMBA a 0,5% em parafina líquida, FERGUSON e cols. (1991) induziram lesões pré-malignas na bolsa da bochecha de hamsters para estudos em microscopia eletrônica de transmissão, constatando aumento da quantidade de vesículas nas células basais, irregularidades na junção entre epitélio e tecido conjuntivo,

desorganização da lâmina basal e presença de células de aspecto cerebriforme com pseudópodos se projetando na direção da lâmina própria.

Em 1979, MAREFAT & ALBRIGHT, estudaram as alterações ultraestruturais de epitélios leucoplásicos e de carcinomas de células escamosas desenvolvidos na borda lateral da língua de hamsters, através da aplicação de DMBA 0,5% em acetona tres vezes por semana, durante o período mínimo de doze semanas e máximo de dezesseis. Antes das aplicações do carcinógeno, foram provocadas na língua escoriações com lima endodôntica. Este procedimento fundamentou-se no trabalho de FUJITA e cols. (1973), o primeiro a demonstrar que o trauma associado a aplicações de DMBA 0,5% em acetona, produzia alterações carcinomatosas na língua em 100% dos animais entre a 13ª e a 25ª semana de tratamento. A importância do trauma foi confirmada, quando todos os animais que receberam tratamento com DMBA durante 8 semanas, seguido de trauma cirúrgico, desenvolveram carcinomas de língua, o que não ocorreu com hamsters que apenas receberam aplicações de carcinógeno (MAEDA & KAMEYAMA, 1986).

Para o estudo em microscopia eletrônica de transmissão da membrana basal e interface entre epitélio e lâmina própria em hiperplasias epiteliais e carcinomas de células escamosas, OTSUBO & KAMEYAMA (1982), utilizaram hamsters divididos em tres grupos. O primeiro grupo não recebeu qualquer tipo de tratamento, no segundo foram realizadas escoriações no terço médio da borda lateral da língua por meio de lima endodôntica e, no terceiro grupo, as aplicações de DMBA a 0,5% em acetona foram associadas ao trauma. As

lesões traumáticas e a aplicação de carcinógeno foram realizadas tres vezes por semana, durante dezesseis semanas. Observou-se somente no último grupo projecões citoplasmáticas das células basais em direcção à lâmina própria, juntamente com irregularidades e descontinuidades da lâmina basal.

As células de Langerhans são as responsáveis pelo início da resposta imune local contra antígenos presentes na pele. MULLER e cols. (1985) através da reacção de ATPase, analisaram o número destas células na pele de animais que receberam aplicações de DMBA a 1% em parafina líquida, durante oito semanas. Houve diminuição das células de Langerhans nas proximidades do tecido neoplásico, e quando as aplicações de DMBA foram suspensas, as células reapareceram e o crescimento tumoral cessou.

Os efeitos da utilização de carcinógenos químicos tem sido extensivamente estudados (MARERAT e cols., 1979; OTSUBO & KAMEYAMA, 1982; ODUKOYA & SHKLAR, 1984; MULLER e cols., 1985; WEITZMAN e cols., 1986; MAEDA & KAMEYAMA, 1986). Os efeitos agudos do DMBA no epitélio bucal de hamster foram estudados após somente três aplicações de DMBA a 0,5% em propilenoglicol. A cinética celular do epitélio foi determinada com auxílio de sulfato de vimblastina e de radioautografia com timidina triciada. Após a aplicação de carcinógeno, houve redução da atividade mitótica das células epiteliais em relação aos animais não tratados, havendo normalização do quadro no período de 2 semanas (HASSAN & SHKLAR, 1985).

De acordo com WEITZMAN e cols. (1986), o peróxido de hidrogênio a 30% potencializa o efeito do DMBA. Utilizando

anticorpos mononucleares, LIN e cols. (1989) estudaram o padrão de queratinização epitelial em hamsters que receberam aplicações de DMBA, observando que em lesões pré-malignas e malignas as proteínas de 56 kd estavam ausentes, enquanto as de baixo peso molecular (50 kd) foram expressadas.

2.2 - ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4NQO)

O óxido de nitroquinolina (4NQO) foi sintetizado em 1945 por OCHIAI e cols. a partir de uma quinolina que ao reagir com peróxido de hidrogênio, incorpora um radical nitro (NAKAHARA e cols., 1957). Em pequenas concentrações (0,001 a 0,002%), o óxido de nitroquinolina tem a capacidade de reduzir a viabilidade de células provenientes de sarcomas de camundongos "in vitro", de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich na forma ascítica e na forma sólida "in vivo" e, de acordo com SAKAI e cols. (1957) tem acentuada ação fungicida "in vitro" sobre o Trichophyton asteroides e Candida albicans.

O 4NQO sofre ativação metabólica no organismo transformando-se então em carcinógeno (STITES e cols., 1987; BOYD & READE, 1988). Enzimas do tipo hidroxilase convertem o 4-nitroquinolina-1-óxido em 4-aminoquinolina-1-óxido (SUGIMURA e cols., 1965; SINGER & GRUNDBERGER, 1983). Estes derivados do 4NQO induzem mutação em bases nitrogenadas, deleções, conversões

genéticas e aberrações cromossômicas como, alongamentos e deformações em cromossomos normais, além de quebras e trocas de cromatina (NAGAO & SUGIMURA, 1976).

NAKAHARA e cols. (1957), constataram que o óxido de nitroquinolina (4NQO) a 0,25% é potente carcinógeno, quando aplicado na pele de camundongos. Os animais apresentaram, após cem dias de aplicação, crescimentos papilomatosos e, após duzentos dias neoplasias malignas.

O 4NQO na carcinogênese bucal, foi introduzido por WALLENIUS & LEKHOLM (1973), relatando a maior resistência da mucosa bucal em relação à pele aos carcinógenos químicos. Segundo os mesmos autores, esta resistência poderia ser devido ao efeito protetor da saliva, atuando como barreira mecânica. A maioria dos pesquisadores que empregam o 4NQO na carcinogênese intrabucal, usam o modelo descrito por WALLENIUS & LEKHOLM (1973), com eventuais e discretas modificações.

LEKHOLM e cols. (1975), observaram histoquimicamente que, durante a carcinogênese provocada pelo 4NQO no palato de ratos, nas regiões de hiperqueratose e displasia epitelial, havia aumento do conteúdo lipídico nas células epiteliais; porém, quando o carcinoma estava presente, as células neoplásicas exibiam perda total deste conteúdo.

Estudando as alterações cromossomais no processo de carcinogênese intrabucal, WALLENIUS e cols. (1975), induziram a xerostomia através de injeções periódicas de nitrato de metil-escopolamina, e aplicaram 4NQO em alguns ratos e DMBA em outros. Constatou-se que o DMBA atravessa a membrana nuclear e age nos

cromossomos durante a interfase e que, o 4NQO age nos cromossomos somente após o rompimento da membrana nuclear, na profase.

Após injeções de tetracloreto de carbono (CCl₄), durante 6 meses e meio, LEKHOLM & WALLENIUS (1976) induziram cirrose hepática em ratos e realizaram estudo comparativo entre ratos normais e cirróticos. Foram feitas aplicações de 4NQO a 0,5% em propilenoglicol, no palato dos animais três vezes por semana, observando-se forte reação inflamatória inicial da mucosa e aumento de sua permeabilidade nos animais cirróticos. A velocidade para o desenvolvimento de carcinomas foi semelhante para os dois grupos.

A indução de transformações pré-cancerosas irreversíveis pelo 4NQO, foi estudada no palato de ratos por SVENSSON & HEYDEN (1982). Períodos curtos de aplicação (1 a 6 semanas), foram seguidos por longos períodos de expectativa para o desenvolvimento de carcinomas; por outro lado, períodos longos de aplicação (mais de 12 semanas), foram seguidos por curto período de expectativa (8 a 21 semanas). Todos os animais desenvolveram carcinomas de células escamosas altamente diferenciados, com produção exuberante de queratina. No estudo de WONG & WILSON (1983), as neoplasias malignas se desenvolveram após 24 semanas de aplicações de 4NQO no palato de ratos. STEIDLER & READE (1984) realizaram aplicações de 4NQO a 0,5% em propanodiol, durante o período máximo de dezesseis semanas, e os animais foram observados por mais de cinquenta semanas. Todos os camundongos desenvolveram carcinomas após cinquenta semanas de observação.

A disqueratose focal acantolítica é uma alteração epitelial que na maioria dos estudos de carcinogênese experimental

precede o desenvolvimento de carcinomas, sendo caracterizada pela formação de fendas suprabasais, células acantolíticas e disqueratóticas, hiperqueratose, paraqueratose e hiperplasia da camada basal. PHILIPSEN & FISKE (1983) relataram a ocorrência de disqueratose em cerca de 50% dos ratos da variedade Wistar que receberam aplicações de 4NQO a 0,5% em propilenoglicol. A substância carcinogênica era depositada no palato dos animais anestesiados em posição supina; após dez minutos a posição do animal era invertida permanecendo assim por mais cinco minutos. O período experimental mais longo foi de dezoito semanas, observando-se que a disqueratose focal acantolítica desenvolveu-se prevalentemente em mucosas aderidas ao osso, como a do palato e da gengiva vestibular. Pode-se ainda, citar o estudo de PRIME e cols. (1986) sobre esta entidade histopatológica, no qual após 36 semanas de aplicação de 4NQO, todos os animais desenvolveram carcinomas invasivos de palato ou de língua. Utilizando ratos Wistar, pode-se estabelecer correlação positiva entre a frequência de aplicação do 4NQO e o grau de hiperplasia (FISKE, 1990).

Em algumas regiões do mundo, a deficiência de ferro é problema de saúde pública, havendo inclusive correlação com a alta incidência de câncer bucal (PRIME e cols., 1983). Com o objetivo de estudar tal correlação, PRIME e cols. (1983) aplicaram o 4NQO a 0,5% em propilenoglicol na mucosa palatina de ratos normais e deficientes em ferro; verificando que a incidência de carcinomas de células escamosas era semelhante em ambos os grupos, porém as neoplasias iniciavam-se mais precocemente nos animais com deficiência de ferro. Além disso, estes animais apresentaram elevada incidência de lesões

carcinomatosas de língua enquanto que os normais mostraram elevada incidência de lesões de palato.

Carcinomas de células escamosas de dorso de língua de ratos, também foram provocados através de ingestão de 4NQO diluído em água a 0,001% durante 68 semanas. Os carcinomas apresentaram dois padrões de crescimento, exofítico e endofítico, sem a ocorrência de metástases (OHNE e cols., 1985).

Substâncias carcinogênicas, quando aplicadas localmente à mucosa de animais de laboratório, podem levar ao desenvolvimento de carcinomas, principalmente de palato duro e de dorso de língua. A obtenção de carcinomas experimentais de borda lateral de língua e de lábio é considerada difícil. Associando a irritação mecânica crônica com aplicações de 4NQO e DMBA, desenvolveram-se com sucesso neoplasias de lábio e borda de língua respectivamente, pois as escoriações provocadas facilitaram a penetração de carcinógeno nas camadas mais profundas do epitélio (FUJINO e cols., 1965; MAREFAT e cols., 1979).

Estudando as etapas de iniciação e promoção em hamster, EVESON & MACDONALD (1977) utilizaram como iniciador da carcinogênese o 4NQO a 0,5% em propilenoglicol e como promotor o óleo de algodão e, STEIDLER & READE (1986) usaram como promotor o forbol-12,13-didecanoato (PDD). Estes autores verificaram que os agentes promotores agilizaram o processo de carcinogênese.

As técnicas imunohistoquímicas são importantes para o diagnóstico e estudo de muitas patologias, incluindo o câncer de boca. Anticorpos monoclonais são frequentemente usados nos estudos de carcinogênese experimental intrabucal para marcar células

inflamatórias específicas e células epiteliais dendríticas por exemplo, e o carcinógeno mais usado para essa finalidade é mais uma vez o 4NQO (MATTHEWS e cols., 1986; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1988; MATTHEWS e cols., 1988; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1989).

3 - XEROSTOMIA

A saúde bucal depende do equilíbrio entre vários componentes da boca como a mucosa, a saliva e a flora microbiana (EDGAR, 1990). A saliva tem ação mecânica e bioquímica, auxiliando nas funções de limpeza e proteção da mucosa. A ação mecânica em grande parte, se deve à formação de camada de muco, rica em glicoproteínas, que confere viscosidade à saliva, mantendo a mucosa permanentemente lubrificada e atenuando o atrito, facilitando a deglutição. A saliva também tem atividade antimicrobiana através de componentes como a lisozima, peroxidase e imunoglobulinas. A presença de anticorpos na saliva dá origem à chamada primeira linha de defesa da mucosa. A IgA secretora é a imunoglobulina que predomina na saliva, sendo produzida por células presentes na lâmina própria das glândulas salivares e bastante resistente às enzimas proteolíticas presentes na saliva (DOLBY, 1975). A IgM também está presente na saliva, porém em menor proporção, sendo originária das glândulas salivares.

Os íons inorgânicos (cálcio, fosfato, fluoreto) são importantes na composição da saliva por terem função tampão, neutralizando ácidos produzidos pela placa bacteriana. Em concentrações adequadas, podem prevenir a desmineralização do esmalte dental e promover eventuais remineralizações de lesões cariosas incipientes (EDGAR, 1990).

O fluxo médio de saliva do ser humano oscila entre 1000 e 1500 ml diários.

As alterações da saliva podem ser qualitativas e quantitativas, sendo que a xerostomia ocorre em graus variáveis, e quando muito acentuada, ocasiona ressecamento da mucosa, com atrofia e inflamação. A língua pode mostrar-se com atrofia de papilas, inflamação, fissuração, desnudação, lobulação e eritema. Quando muito severa, a xerostomia pode levar ao aumento da prevalência de cárie, ocasionando também dificuldades na mastigação e na deglutição. Os lábios podem ficar secos e com fissuras nas comissuras. Os sintomas mais comuns são sensibilidade dolorosa difusa associada à sensação de ardência ou queimação da mucosa.

A xerostomia pode ter causas locais e sistêmicas. Dentre as locais estão pode-se citar aplasia glandular, inflamações seguidas de alterações degenerativas, radioterapia com conseqüente atrofia e fibrose do parênquima glandular. Os fatores sistêmicos mais comuns são hipovitaminoses, diabetes melito, anemias, doenças hepáticas, alteração emocional, efeitos colaterais de drogas como tranquilizantes, atropina e anti-histamínicos e, Síndrome de Sjogren, hipertensão, má-nutrição, disfunções hormonais, pancreatite, acromegalia e doenças neurológicas (SLOMIANY e cols.,

1986; MANDEL, 1990).

Quando induzida em animais de laboratório, a xerostomia causa maior incidência de cárie dental (ITO, 1990); aumenta a permeabilidade da mucosa a medicamentos (DEAN & HIRAMOTO, 1986) e predispõe à implantação de Candida albicans no epitélio da mucosa bucal (JORGE, 1991).

3.1 - XEROSTOMIA E CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

Considera-se que a mucosa bucal dos animais de laboratório é mais resistente do que a pele a carcinógenos químicos. Foliculos pilosos e glândulas sebáceas da pele, funcionariam como porta de entrada para várias substâncias e, a saliva atuaria diminuindo a permeabilidade da mucosa bucal. Entretanto, existem poucos relatos na literatura em que efetivamente se estudou a atuação da saliva no processo de carcinogênese.

A remoção cirúrgica das glândula salivares maiores reduz em cerca de 90% o fluxo salivar de ratos (WALLENIS, 1966). Após extensos estudos WALLENIS (1966) concluiu que a saliva tem inequívoco efeito protetor durante a carcinogênese provocada pelo DMBA. Após onze meses de aplicações de DMBA na boca de ratos, tres vezes por semana, observou-se o aparecimento de carcinomas nos animais xerostômicos, fato que não ocorreu em ratos normais. O mesmo autor verificou ainda, através da microscopia de fluorescência, que nos ratos xerostômicos o DMBA penetrava na camada córnea do epitélio e atingia a lâmina própria, permanecendo no local 48 horas após sua

aplicação.

Através da aplicação de DMBA em hamster, com secreção salivar reduzida por excisão cirúrgica das glândulas salivares maiores, **STORMBY & WALLENIUS** (1964) observaram que os animais xerostômicos mostraram aumento da frequência de lesões cancerosas no palato em relação aos animais normais.

Simulando o que ocorre com as glândulas salivares de humanos após administração de anti-histamínicos, anti-hipertensivos, diuréticos, barbitúricos, ansiolíticos e anti-depressivos, **LEKHOLM & WALLENIUS** (1976) induziram xerostomia intermitente em ratos através de injeções de nitrato de metil-escopolamina e utilizaram como carcinógeno o 4NQO, observando que o tempo necessário para que todos os ratos xerostômicos desenvolvessem câncer de boca era 33% menor em relação aos normais.

Como o 4NQO é atualmente a substância mais utilizada em estudos de carcinogênese experimental e, devido à ausência de estudos associando a xerostomia permanente ao câncer bucal provocado por 4NQO, este trabalho tem o abjetivo de avaliar em ratos sialoadenectomizados os efeitos do 4NQO na mucosa bucal.

PROPOSICÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é verificar os efeitos do 4NQO no palato e língua de ratos Wistar que tiveram as glândulas salivares maiores removidas cirurgicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados 108 ratos Wistar (Rattus norvegicus albinus), machos, pesando cerca de 200g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração Purina e água "ad libitum", e mantidos em caixas plásticas em grupos de cinco. Nos períodos de um, dois e três meses foram usados sessenta animais; divididos em quatro grupos de cinco: normal, siloadenectomizado, normal + 4NQO e sialoadenectomizado + 4NQO. No período de seis meses usou-se doze ratos para cada grupo.

A xerostomia foi obtida pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, de acordo com CHEYNE (1939). Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de hidrato de cloral a 10%, 0,4g/kg de peso corporal e em seguida submetidos a tricotomia, assepsia local, incisão de 3cm na região cervical, e posterior divulsão tecidual para a localização das glândulas salivares. Na região paramediana, à frente da traquéia, localizam-se as glândulas submandibulares e sublinguais que macroscopicamente têm aparência unilobular, possibilitando a remoção conjunta. As glândulas parótidas encontram-se aderidas à bochecha e se estendem da região massetéica até a clavícula, sendo alongadas no sentido cefalo-caudal, e possuindo posteriormente prolongamento que se insere na cartilagem retroauricular. Após cuidadosa divulsão e ligamento dos vasos sanguíneos de maior calibre, as glândulas salivares maiores foram removidas.

A substância carcinogênica utilizada foi o óxido de nitroquinolina (4NQO) diluído a 0,5% em propilenoglicol. A aplicação

de aproximadamente 11 μ l de solução foi feita no palato de ratos imobilizados não anestesiados, com auxílio de pinça porta grampos para uso odontológico adaptada, e de pincel nº2. Este procedimento foi repetido 4 vezes por semana durante os períodos experimentais, sendo que após cada aplicação os animais foram privados de água durante 5 horas para permitir maior tempo de contato da substância com a mucosa palatina. Durante o período experimental os animais foram pesados quinzenalmente.

Os ratos foram sacrificados por inalação excessiva de éter etílico, e a maxila e a língua fixadas em formol tamponado a 10%. Após observações macroscópicas com auxílio de lupa estereoscópica as maxilas foram descalcificadas em ácido tricloroacético a 6% por 4 dias e seccionadas transversalmente em 3 partes, na região dos 1º, 2º e 3º molares. A língua foi dividida longitudinalmente em quatro partes. A inclusão foi feita em parafina, e os cortes de 7 μ m corados com H&E. Linfonodos cervicais e o estômago foram removidos dos animais do grupo de seis meses e observados macro e microscopicamente.

Para a quantificação macroscópica do palato e língua, considerou-se apenas a alteração mais grave para cada animal.

As alterações macroscópicas do palato e língua estão dispostas abaixo em ordem crescente de gravidade.

Palato:

- * mucosa esbranquiçada
- * perda de definição das rugosidades
- * aspecto papilomatoso
- * ulceração deformante e mobilidade dentária

Língua:

- * mucosa esbranquiçada
- * atrofia de papilas
- * aspecto papilomatoso
- * papiloma
- * ulceração pequena
- * ulceração grande

Para a análise microscópica dos palatos foi usado somente um corte de cada região (1º, 2º e 3º molar), ou seja, três cortes para cada animal. O mesmo ocorreu com as línguas, que foram divididas em quatro regiões longitudinalmente. Portanto, na língua as quantificações foram feitas utilizando-se apenas um corte para cada região e quatro cortes por animal.

Para a comparação entre as médias dos pesos dos animais foi aplicado o teste "t" de Student com nível de significância estabelecido em 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

PESO CORPORAL

Durante os períodos experimentais o peso corporal dos ratos normais esteve sempre acima do peso dos ratos xerostômicos tratados com 4NQO, os quais nas 2 últimas semanas do experimento, exibiram emagrecimento acentuado, porém a diferença entre as médias não foi estatisticamente significante.

PALATO E LÍNGUA

Os animais normais e sialoadenectomizados não mostraram alterações macro e microscópicas (figs. 1 e 2), e os dados a seguir referem-se apenas aos grupos tratados com 4NQO. No palato dos mesmos as alterações ocorreram na região intermolar, e na língua e no tubérculo intermolar.

PALATO

1 MÊS

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

O palato de ratos normais e sialoadenectomizados tratados com 4NQO durante 1 mês estava normal (tab.1).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Nenhuma alteração microscópica foi observada no palato dos animais normais e sialoadenectomizados (tab. 2).

2 MESES

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Após dois meses de aplicação de 4NQO, observou-se que o palato dos cinco ratos normais estava normal; enquanto que dois sialoadenectomizados apresentaram na região intermolar perda de definição das rugosidades, um com aspecto papilomatoso e outros dois mantiveram-se com aspecto normal (tab. 1).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Observou-se no palato dos cinco ratos normais um total de oito áreas epiteliais disqueratóticas que são caracterizadas por células eosinófilas, parcialmente hialinizadas, arredondadas e circundadas por halo claro (fig.3). Nos ratos sialoadenectomizados verificou-se a presença de onze áreas de células disqueratóticas em quatro animais e três disqueratoses focais acantolíticas em dois

animais (fig.4; tab. 2). A disqueratose focal acantolítica é uma alteração epitelial basicamente formada por fendas epiteliais contendo no interior várias células disqueratóticas soltas, podendo variar em extensão e severidade.

3 MESES

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Os cinco ratos normais apresentaram mucosa do palato com coloração esbranquiçada (fig.5). Dos sialoadenectomizados, apenas um mostrou mucosa esbranquiçada, enquanto que os outros quatro o aspecto papilomatoso (fig.7; tab. 1).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Nos ratos normais após três meses de tratamento com 4NQO, observou-se no palato dez áreas de células disqueratóticas em cinco animais, e três áreas de disqueratose focal acantolítica em três ratos (fig.6). Nos sialoadenectomizados observou-se a presença de duas áreas de células disqueratóticas em cinco animais, e treze de disqueratose focal acantolítica em quatro animais (fig.8; tab. 2).

6 MESES

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Dos doze ratos normais, cinco exibiram perda de definição das rugosidades (fig.9), cinco aspecto papilomatoso (fig.10) e dois ulceração deformante, com mobilidade dos dentes envolvidos (figs.11 e 12). Dos ratos sialoadenectomizados, cinco apresentaram mucosa de aspecto papilomatoso (figs.21, 22 e 23) e os sete restantes ulceração deformante com mobilidade dentária associada (fig.24 e 29; tab. 1).

As ulcerações foram bilaterais em quatro ratos xerostômicos e em um normal sendo que em três ratos xerostômicos e em um normal as ulcerações foram unilaterais.

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Observou-se a presença de dezesseis áreas de células disqueratóticas no palato de nove ratos (fig.14); treze áreas de carcinoma associadas a disqueratose focal acantolítica em seis animais e quarenta e sete de disqueratose focal acantolítica em áreas sem carcinoma em doze ratos (figs.15 e 16); notou-se ainda, a presença de um papiloma (fig.13) em um rato e dezoito áreas de carcinoma (figs.19 e 20), sendo três superficialmente invasivos e quinze com invasão de tecido ósseo subjacente (fig.17). No palato dos ratos sialoadenectomizados, estavam presentes vinte e duas áreas de

células disqueratóticas em nove animais (fig.30); trinta e oito áreas de disqueratose focal acantolítica associadas a carcinomas em onze animais (fig.32), e sessenta e sete áreas de disqueratose focal acantolítica em doze ratos não associadas a regiões de carcinoma (fig.27). Verificou-se ainda, a presença de dez papilomas em sete animais e trinta e duas áreas de carcinoma, sendo uma de carcinoma superficialmente invasivo e trinta e uma de carcinoma com invasão de tecido ósseo (tab. 3).

Oito ratos normais apresentaram carcinoma, sendo que em três o carcinoma era superficialmente invasivo e em seis com invasão do tecido ósseo. Dos sialoadenectomizados, um mostrou carcinoma superficialmente invasivo e dez com invasão de tecido ósseo subjacente (fig.28).

Nos carcinomas superficialmente invasivos, o epitélio pavimentoso estratificado estava hiperqueratinizado, acantótico e por vezes com células apresentando queratinização individual ou início de formação de pérola córnea, pleomorfismo nuclear, picnose, figuras de mitose em número aumentado e hiperchromatismo. Em algumas áreas, o limite entre as células epiteliais e as células da lâmina própria era pouco perceptível (fig.27). Por vezes o epitélio era recoberto por células inflamatórias, mostrando microabscessos com polimorfonucleares em degeneração e hemácias. A lâmina própria exibiu poucas fibras colágenas, intenso infiltrado inflamatório do tipo mononuclear, além de vasos sanguíneos hiperemiados e grande quantidade de fibras nervosas.

Os carcinomas invasivos se caracterizavam pela presença de epitélio pavimentoso estratificado invadindo a lâmina própria,

TABELA 2. PRESENÇA DE ÁREAS DE CÉLULAS DISQUERATÓTICAS E DISQUERATOSE FOCAL ACANTOLÍTICA NO PALATO DE RATOS NORMAIS (N) E SIALOADENECTOMIZADOS (S) TRATADOS COM 4NQO DURANTE 1, 2 E 3 MESES. OS VALORES CORRESPONDEM AO NÚMERO TOTAL DE LESÕES E ENTRE PARÊNTESES O NÚMERO DE ANIMAIS AFETADOS. n=5

PERÍODO (MESES)	1		2		3	
GRUPO	N	S	N	S	N	S
área de células disqueratóticas	0	0	8(5)	11(4)	10(5)	2(5)
disqueratose focal acantolítica	0	0	0	3(2)	3(3)	13(4)

TABELA 3. ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO PALATO DE RATOS NORMAIS (N) E SIALOADENECTOMIZADOS (S) TRATADOS COM 4NQO DURANTE 6 MESES, ONDE SE OBSERVA A QUANTIDADE DE ALTERAÇÕES ENCONTRADA. OS VALORES ENTRE PARENTESES REPRESENTAM O Nº DE RATOS AFETADOS. n=12

	N	S
área de células disqueratóticas	16(9)	22(9)
D.F.A*		
em área com carcinoma	13(6)	38(11)
em área sem carcinoma	47(12)	67(12)
papiloma	1(1)	10(7)
carcinoma superficialmente invasivo	3(3)	1(1)
carcinoma com invasão óssea	15(6)	31(10)

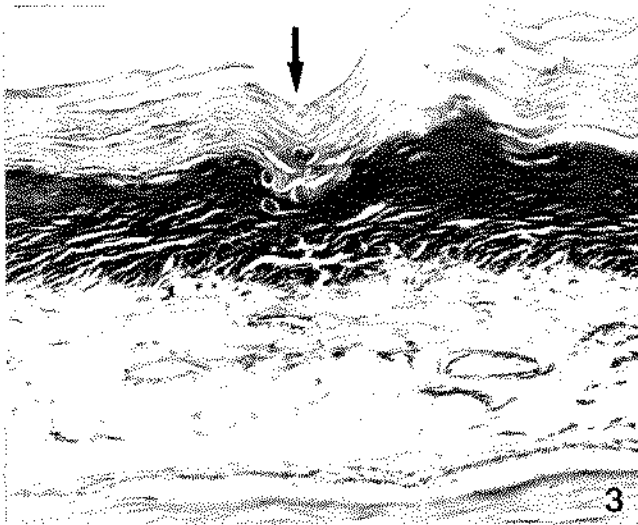
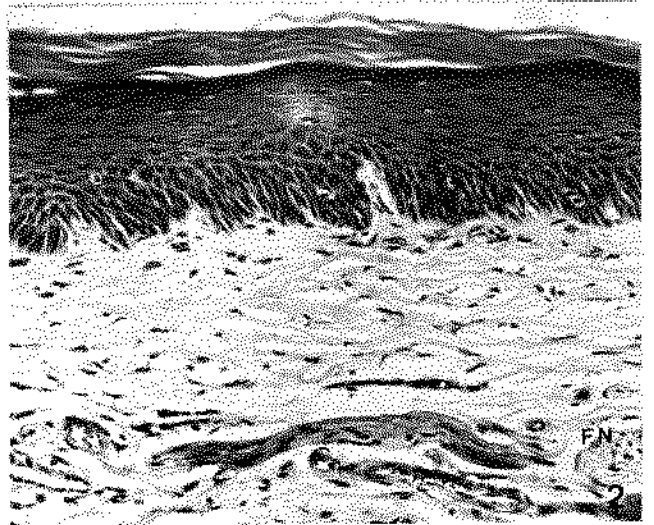
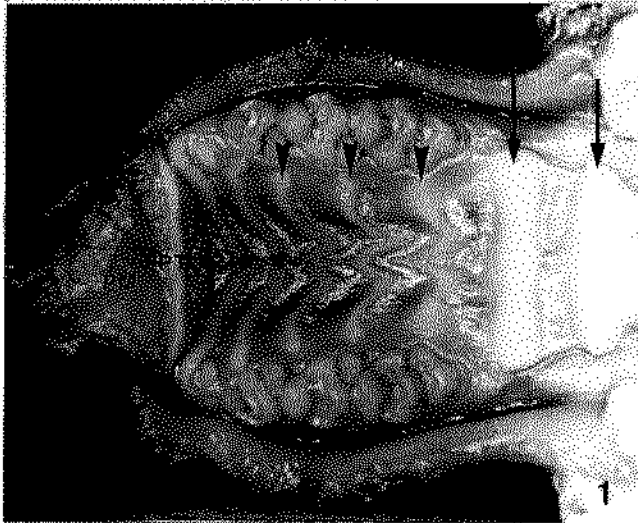
* Disqueratose Focal Acantolítica.

FIG.1-Aspecto macroscópico de rato normal que não recebeu aplicação de 4NQO, mostrando as rugosidades palatinas lisas (setas) na região antemolar; três rugosidades em forma de M (cabeça de seta) e duas em forma de V (*) na região intermolar. Na região posterior aos molares observa-se linha esbranquiçada denominada de ponte transversa (PT) a qual separa o palato duro do palato mole (PM) H&E 5 X.

FIG.2-Aspecto microscópico do palato duro formado de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. No tecido conjuntivo observa-se fibras colágenas, vasos sanguíneos e feixes nervosos (FN) H&E 190 X.

FIG.3-Mucosa de rato normal após 2 meses de tratamento com 4NQO, mostrando epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado com células disqueratóticas (seta) circundadas por halo esbranquiçado. A camada basal apresenta-se parcialmente desorganizada. No tecido conjuntivo existem vasos sanguíneos, fibras colágenas, tecido adiposo e tecido ósseo H&E 190 X.

FIG.4-Mucosa palatina de rato xerostômico após 2 meses de tratamento com 4NQO revestida por epitélio pavimentoso hiperqueratinizado com disqueratose focal acantolítica em estágio inicial, onde se observa fendas epiteliais (seta) contendo células disqueratóticas no interior. A camada basal mostra sinais de desorganização e o conjuntivo subjacente exhibe algumas células inflamatórias H&E 190 X.



FIGS. 5 e 6- Mucosa do palato de rato normal após 3 meses de tratamento com 4NQO.

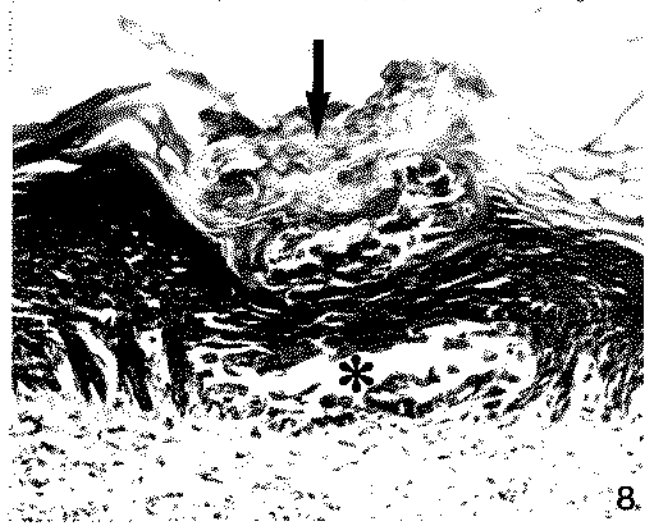
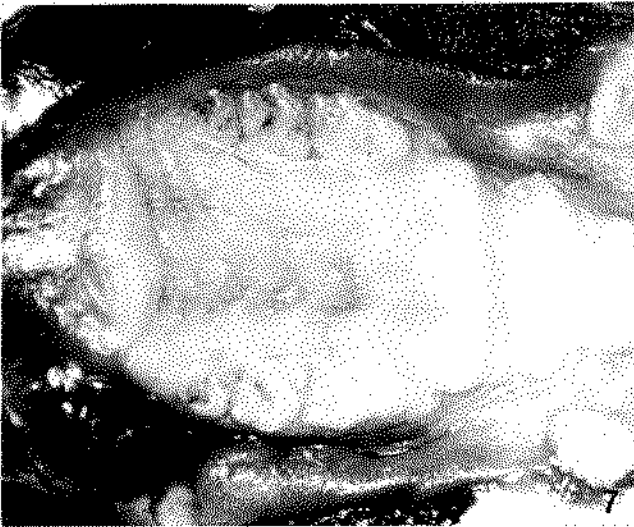
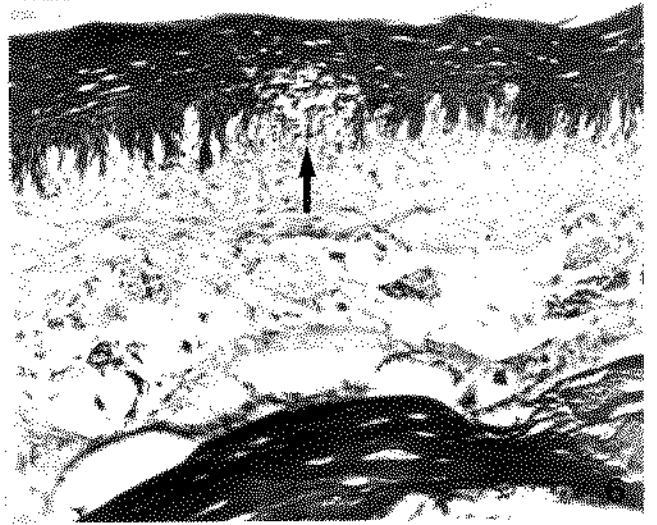
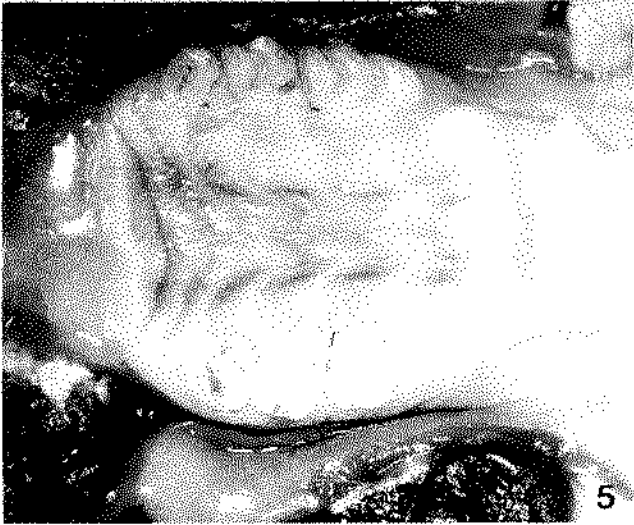
FIG. 5- Macroscopicamente há perda de nitidez das rugosidades palatinas e esbranquiçamento das mesmas 5 X.

FIG. 6- Microscopicamente o epitélio pavimentoso estratificado tem as camadas basal e suprabasal vacuolizadas (seta). No tecido conjuntivo há fibras colágenas densamente arrajadas, tecido adiposo e tecido ósseo normal H&E 190 X.

FIGS. 7 e 8- Mucosa do palato duro de rato xerostômico após 3 meses de tratamento com 4NQO.

FIG. 7- Macroscopicamente observa-se perda de definição das rugosidades palatinas na região intermolar e aspecto discretamente papilomatoso 5 X.

FIG. 8- Microscopicamente o epitélio pavimentoso estratificado está hiperqueratinizado com típica área de disqueratose focal acantolítica com fenda suprabasal (*) e células disqueratóticas soltas no interior. Nota-se também células disqueratóticas próximas à queratina (seta) H&E 190 X.



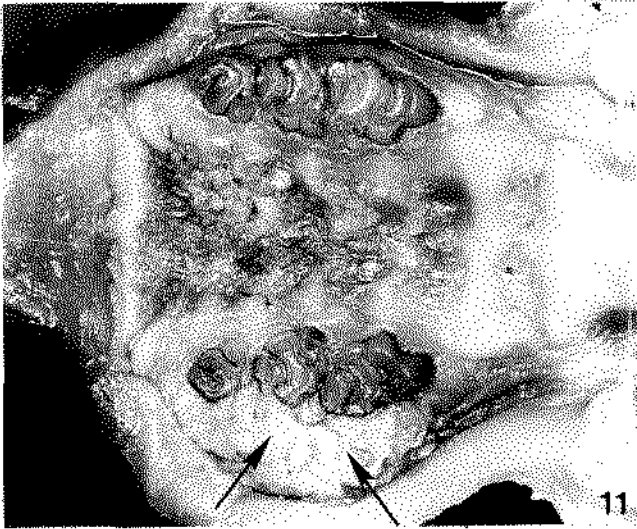
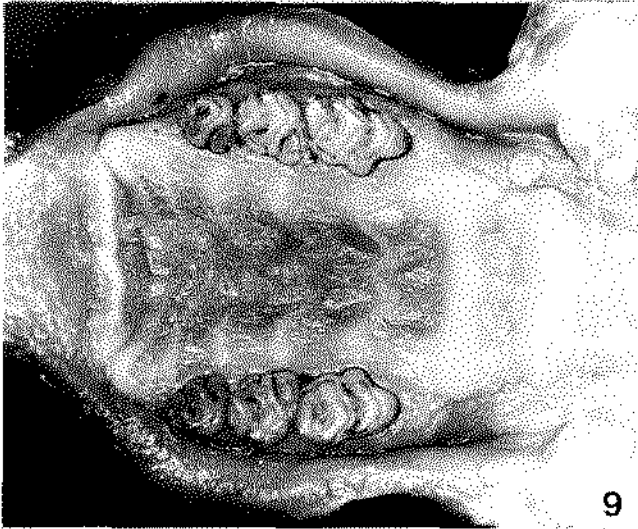
FIGS. 9, 10, 11 e 12-Aspecto macroscópico da mucosa do palato duro de rato normal após 6 meses de aplicação de 4NQO.
5 X.

FIG. 9-Perda de definição das rugosidades palatinas na região intermolar.

FIG. 10-Aspecto papilomatoso na região central e na gengiva palatina dos molares do lado esquerdo.

FIG. 11-Aspecto papilomatoso na região central e extensa ulceração na porção vestibular do lado direito (setas).

FIG. 12-Extensa ulceração deformante (cabeças de seta), com exposição da raiz do 2º molar (seta) e deslocamento do 3º molar (*).



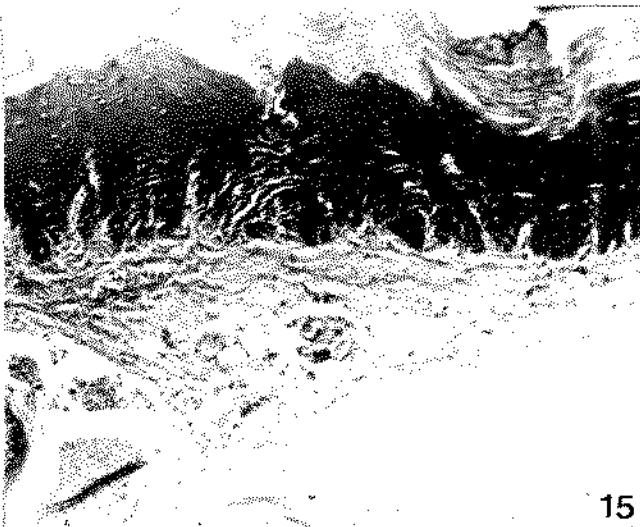
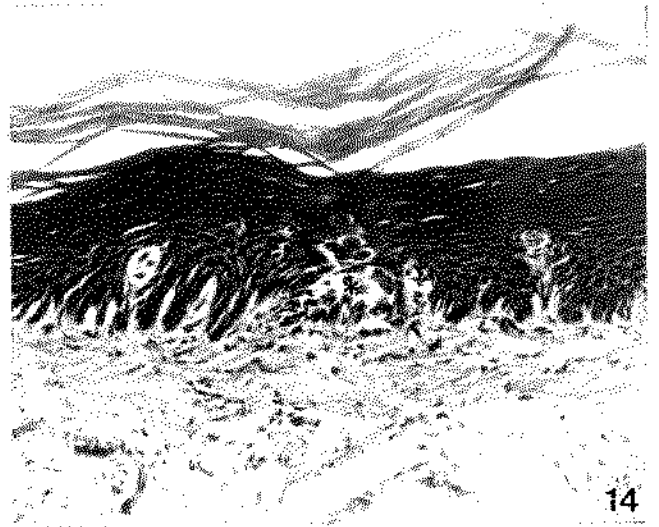
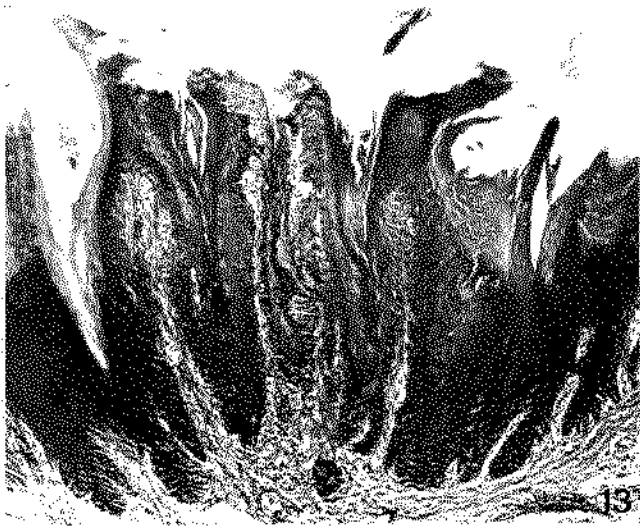
FIGS. 13, 14, 15 e 16-Aspectos microscópicos da mucosa palatina de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG. 13-Hiperplasia papilomatosa formada de epitélio hiperqueratinizado e conjuntivo infiltrado de células inflamatórias H&E 75 X.

FIG. 14-Epitélio hiperqueratótico, mostrando disqueratose focal acantolítica com presença de células disqueratóticas (cabeça de seta) e pequena fenda com desorganização da camada basal (*) H&E 189 X.

FIG. 15-Epitélio acantótico e hiperqueratótico, com área de células disqueratóticas que caracterizam uma disqueratose focal acantolítica em estágio inicial. No tecido conjuntivo observa-se densos feixes de fibras colágenas H&E 75 X.

FIG. 16-Disqueratose focal acantolítica da figura anterior em maior aumento, evidenciando as células disqueratóticas presentes em toda a espessura do epitélio e pequenas fendas epiteliais acompanhadas de desorganização da camada basal H&E A.R. 300 X.



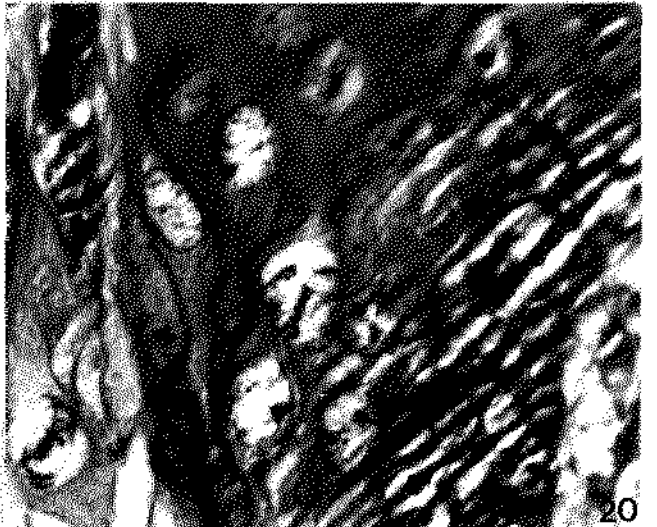
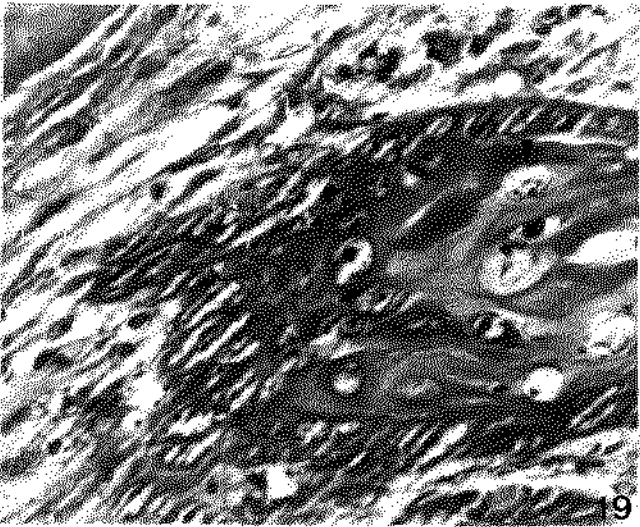
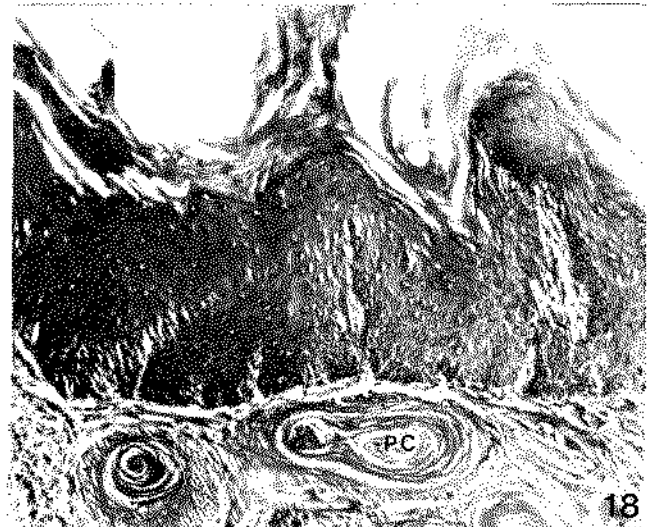
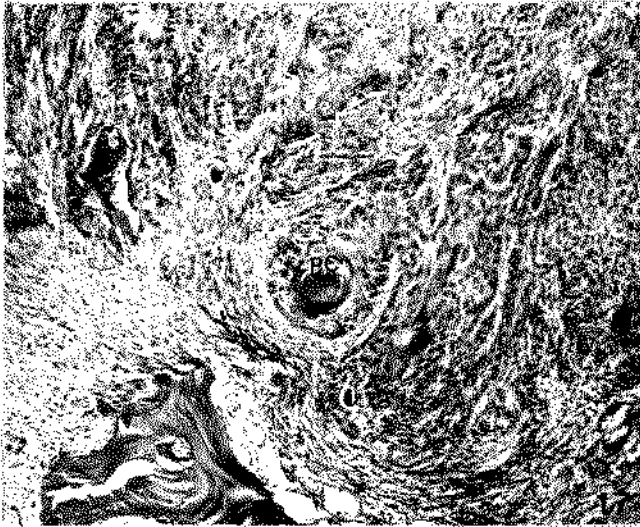
FIGS.17, 18, 19 e 20-Mucosa palatina de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG.17-Intensa proliferação de células neoplásicas onde se observa pérolas córneas (PC) e fragmentos de tecido ósseo H&E 75 X.

FIG.18-Epitélio hiperqueratinizado e acantótico adjacente a ulceração carcinomatosa. No conjuntivo subjacente nota-se pérolas córneas (PC) no centro das ilhas de tecido neoplásico H&E 75 X.

FIG.19-Epitélio mostrando células neoplásicas com pleomorfismo e desintegração de cromatina (cabeça de seta) H&E 480 X.

FIG.20-Células com pleomorfismo, núcleos hipercorados e desintegração da cromatina H&E 600 X.



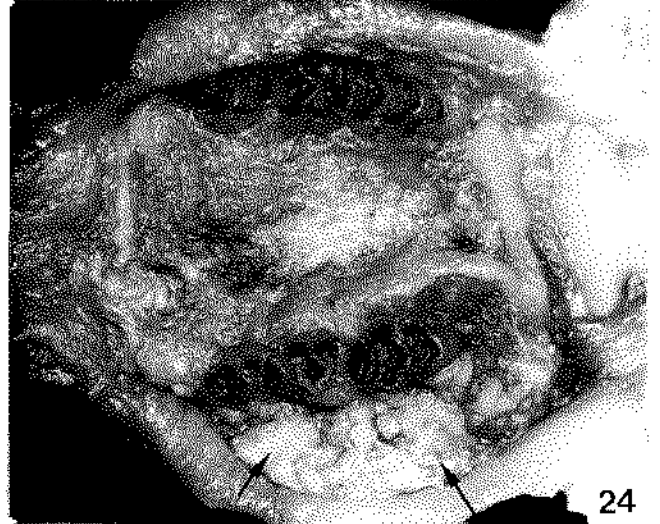
FIGS.21, 22, 23 e 24-Aspectos macroscópicos da mucosa do palato de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO 5 X.

FIG.21-Região intermolar com perda de definição das rugosidades palatinas e aspecto discretamente papilomatoso.

FIG.22-Região intermolar de aspecto papilomatoso 5 X.

FIG.23-Região intermolar de aspecto papilomatoso e pequena ulceração na região palatina adjacente ao 3º molar (cabeças de seta).

FIG.24-Extensa ulceração carcinomatosa que se estendeu para a região vestibular (setas).



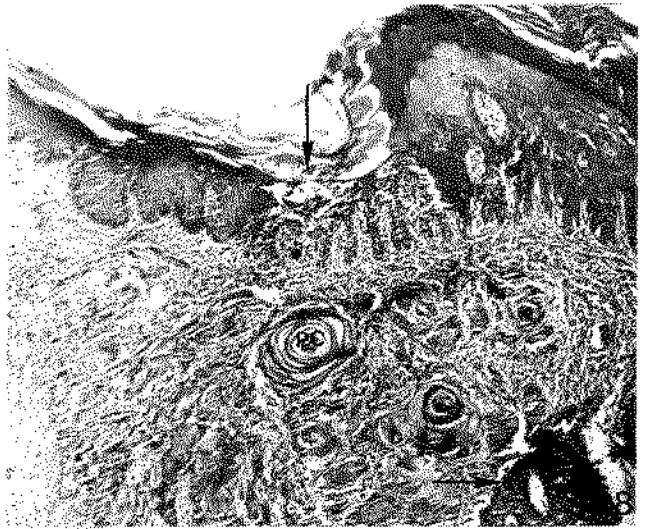
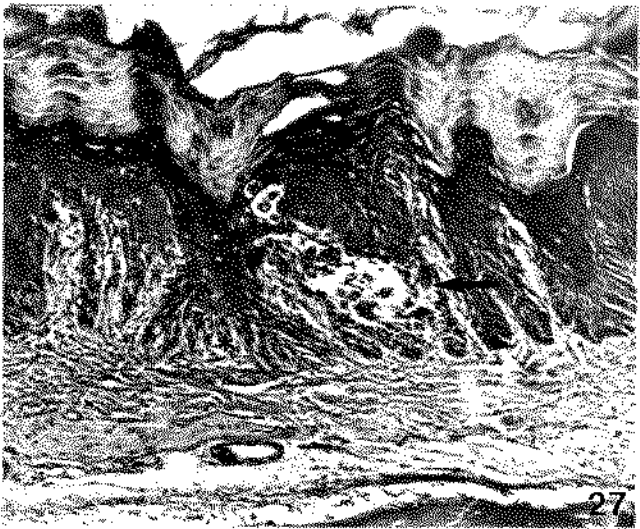
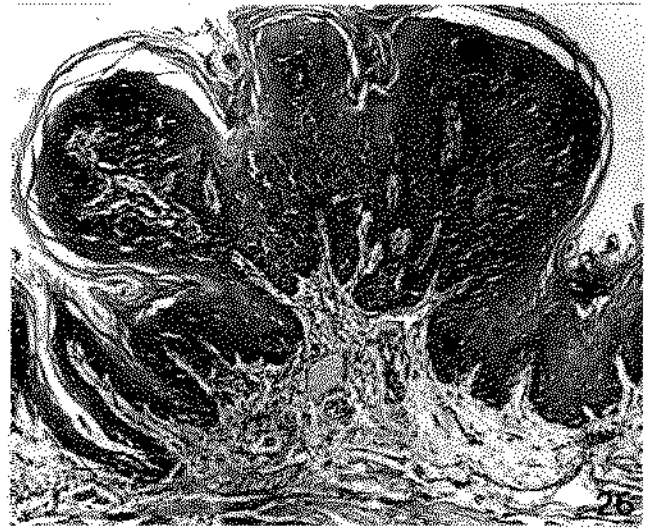
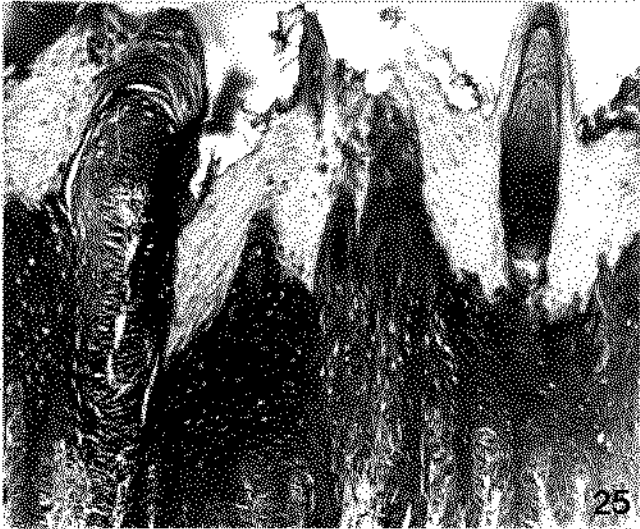
FIGS.25, 26, 27 e 28-Aspectos microscópicos da mucosa palatina de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG.25-Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado e hiperplásico H&E 95 X.

FIG.26-Papiloma de características benignas com epitélio displásico e hiperqueratótico; nas áreas adjacentes o epitélio é hiperplásico. O tecido conjuntivo é rico em fibras colágenas densamente arranjadas contendo algumas células inflamatórias H&E 75 X.

FIG.27-Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado e acantótico com disqueratose focal acantolítica (seta) em que se observa células acantolíticas hialinizadas soltas no interior da fenda epitelial. A membrana basal não é bem nítida, dificultando a delimitação entre epitélio-conjuntivo (*). Na lâmina própria observa-se fibras colágenas, vasos sanguíneos e tecido ósseo H&E 75 X.

FIG.28-Epitélio acantótico e hiperqueratinizado com área de disqueratose focal acantolítica (seta). No tecido conjuntivo subjacente nota-se grande quantidade de ilhas de tecido neoplásico e pérolas córneas (PC) invadindo o tecido ósseo subjacente (seta) H&E 75 X.



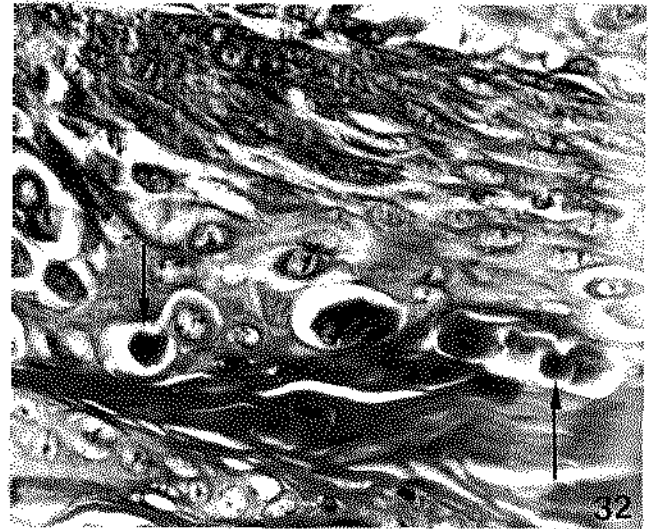
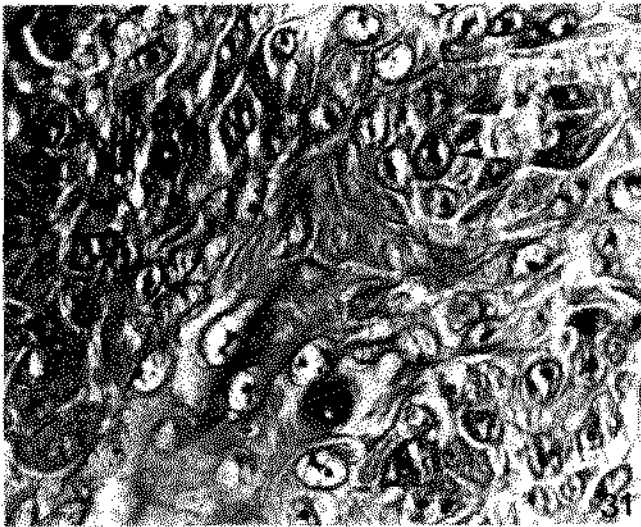
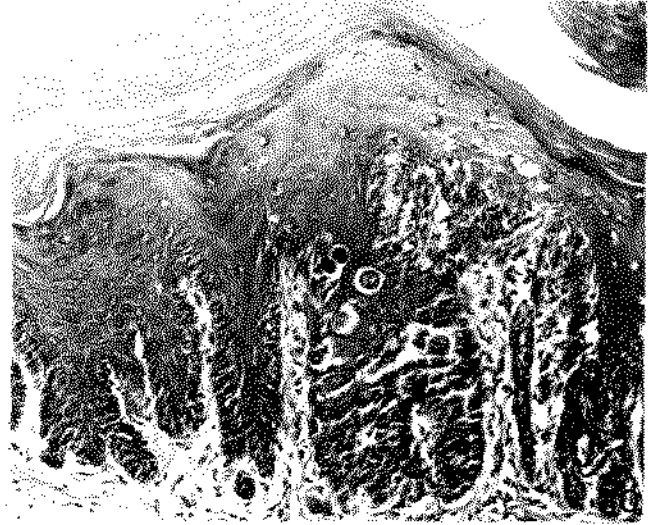
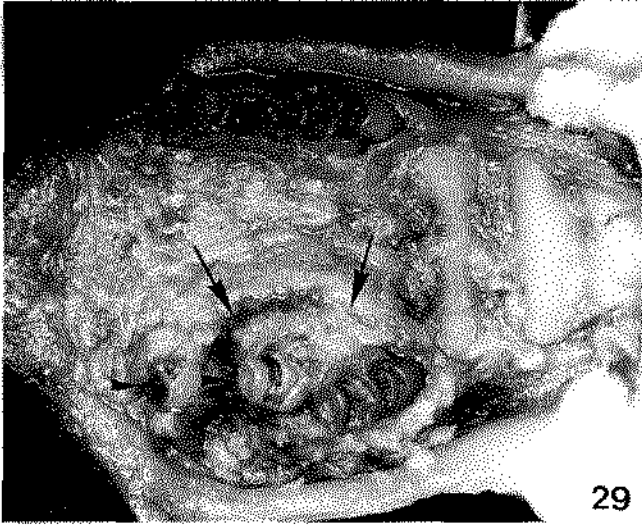
FIGS.29, 30, 31 e 32-Palato de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQD.

FIG.29-Ulceração deformante (setas) causando deslocamento dos molares (cabeças de seta) 5 X.

FIG.30-Epitélio hiperqueratótico e acantótico com discreta disqueratose focal acantolítica. Observa-se no tecido conjuntivo discreto infiltrado inflamatório mononuclear H&E 189 X.

FIG.31-Células epiteliais com pleomorfismo, atipia celular, picnose e hipercromatismo nuclear (cabeça de seta) H&E 480 X.

FIG.32-Células disqueratóticas (setas) em área de carcinoma bem diferenciado 480 X.



LÍNGUA

1 MÊS

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Tanto os ratos normais como os xerostômicos não apresentaram qualquer alteração língua após 1 mês de aplicação de ANGO (fig.41; tab. 5).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Nenhum dos ratos normais apresentou alterações microscópicas, no entanto, nos sialoadenectomizados verificou-se a presença de treze áreas de modificação de papilas com aplainamento das mesmas e hiperqueratose em cinco animais (fig. 34).Notou-se duas áreas de células disqueratóticas em dois ratos (fig. 33;tab. 5).

2 MESES

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Os cinco ratos normais mostraram a mucosa da língua esbranquiçada, sendo que os cinco xerostômicos apresentaram atrofia de papilas (tab. 4).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Observou-se oito áreas de modificação de papilas com aplaimamento e hiperqueratose em três animais e duas áreas de células disqueratóticas em um rato (fig. 35). Nos sialoadenectomizados verificou-se vinte e sete áreas de modificação de papilas em cinco ratos, dez áreas de células disqueratóticas em cinco ratos, uma área de disqueratose focal acantolítica e um papiloma (fig.36; tab. 5).

3 MESES

ASPECTO MACROSCÓPICOS

Um rato normal mostrou mucosa da língua esbranquiçada e quatro exibiram atrofia de papilas (fig.37). No grupo sialoadenectomizado, dois mostraram atrofia de papilas linguais e três exibiram mucosa de aspecto papilomatoso (fig.39; tab. 4).

ASPECTO MICROSCÓPICOS

Observou-se nos ratos normais tratados com 4N00, vinte e oito áreas de modificação de papilas em cinco animais (fig. 38), seis áreas de células disqueratóticas em três animais e um papiloma. Nos ratos sialoadenectomizados, verificou-se a presença de trinta e quatro áreas de modificação de papilas em cinco ratos, oito áreas de células disqueratóticas em quatro ratos, três áreas de disqueratose

focal acantolítica (fig.40) em dois ratos e um papiloma em um rato (tab. 5).

6 MESES

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Dos ratos normais que receberam aplicação de 4NQO por 6 meses, um apresentou a mucosa da língua de coloração esbranquiçada (fig.42), dois atrofia de papilas, dois mucosa de aspecto papilomatoso e outros dois com papiloma (fig.43). Foram identificados cinco animais com ulceração, sendo considerada pequena em um e grande em quatro (fig.44 e 49). No grupo sialoadenectomizado observou-se dois ratos com mucosa lingual de aspecto papilomatoso (fig.53), um com papiloma (fig.54), cinco com ulceração pequena (fig.54) e quatro com ulceração grande (figs.55 e 56; tab. 5).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Nos ratos normais tratados com 4NQO, observou-se a presença de quarenta e quatro áreas de modificação de papilas da língua com aplainamento das mesmas e hiperqueratose (fig.45) em doze ratos e, vinte áreas de células disqueratóticas em doze ratos (fig. 47). Verificou-se também oito áreas de disqueratose focal acantolítica associada a áreas de carcinoma em quatro ratos, e

dezesseis áreas de disqueratose em regiões sem carcinoma em nove ratos. Foram encontrados ainda três papilomas em três ratos (fig. 46), treze carcinomas superficialmente invasivos em quatro ratos (fig. 48), e três carcinomas com franca invasão muscular em três animais (fig. 50).

No grupo xerostômico, estavam presentes sessenta e cinco áreas com modificação de papilas em doze animais (fig. 57), dez áreas de células disqueratóticas em seis ratos. Observou-se doze áreas de disqueratose focal acantolítica associada a áreas de carcinoma em sete ratos (fig. 58) e, dezoito disqueratoses em áreas livres de carcinoma em oito animais. Foram encontrados quatro papilomas em três ratos, seis carcinomas superficialmente invasivos em cinco ratos e treze carcinomas com invasão muscular em seis ratos (fig. 59; tab. 7).

Constatou-se que três ratos normais apresentaram carcinoma superficialmente invasivo, e quatro carcinomas com franca invasão muscular, totalizando sete ratos normais com carcinoma. Por outro lado, dez ratos sialoadenectomizados apresentaram carcinoma, sendo em cinco ratos superficialmente invasivo e, em outros seis o carcinoma invadiu a camada muscular subjacente.

Nos carcinomas superficialmente invasivos, observou-se epitélio hiperqueratinizado, acantótico e severamente displásico com regiões de perda de continuidade da camada basal onde se tornava difícil a distinção entre células do tecido conjuntivo e do epitélio (fig. 60), por vezes era observada presença de células queratinizadas individualmente, hiperchromatismo e pleomorfismo nuclear com desorganização das camadas epiteliais.

Os carcinomas dos ratos normais e xerostômicos eram caracterizados por úlcera com células epiteliais proliferando pela lâmina própria (fig.59), exibindo produção exuberante de pérolas de queratina e atipias celulares. Por vezes, observou-se áreas de necrose e microabscesso intraepiteliais (fig.59). O epitélio das porções adjacentes mostrou acantose e hiperqueratose com hiperplasia da camada basal e infiltrado de células inflamatórias por todo o epitélio, inclusive camada córnea. Algumas vezes observou-se nestas regiões formações papilomatosas bem desenvolvidas ou mesmo iniciais. O tecido conjuntivo subjacente apresentou-se intensamente infiltrado por células inflamatórias mononucleares com predomínio de macrófagos. O tecido muscular em alguns casos mostrou-se quase completamente infiltrado pelas células neoplásicas. Em todas as peças analisadas os carcinomas de células escamosas eram altamente diferenciados.

TABELA 4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DA LÍNGUA DE RATOS NORMAIS (N) E SIALOADENECTOMIZADOS (S) TRATADOS COM ANGO. PARA CADA ANIMAL FOI CONSIDERADA APENAS A ALTERAÇÃO MAIS ACENTUADA.

PERÍODO (MESES)	1		2		3		6	
Nº DE ANIMAIS	5		5		5		12	
GRUPO	N	S	N	S	N	S	N	S
aspecto normal	5	5	0	0	0	0	0	0
mucosa esbranquiçada	0	0	5	0	1	0	1	0
atrofia de papilas	0	0	0	5	4	2	2	0
aspecto papilomatoso	0	0	0	0	0	3	2	2
papiloma	0	0	0	0	0	0	2	1
ulceração pequena*	0	0	0	0	0	0	1	5
ulceração grande**	0	0	0	0	0	0	4	4

* ulceração pequena - diâmetro (5mm

** ulceração grande - diâmetro > 5mm

TABELA 5. PRESENÇA DE ÁREAS DE CÉLULAS DISQUERATÓTICAS E DISQUERATOSE FOCAL ACANTOLÍTICA NA LÍNGUA DE RATOS NORMAIS (N) E SIALOADENECTOMIZADOS (S) TRATADOS COM 4NQO DURANTE 1, 2 E 3 MESES. OS VALORES CORRESPONDEM AO NÚMERO TOTAL DE LESÕES E ENTRE PARENTÊSES O NÚMERO DE ANIMAIS AFETADOS. n=5

PERÍODO (MESES)	1		2		3	
	N	S	N	S	N	S
modificação de papilas (aplainamento e hiperqueratose)	0	13(5)	8(3)	27(5)	28(5)	34(5)
área de células disqueratóticas	0	2(2)	2(1)	10(5)	6(3)	8(4)
disqueratose focal acantolítica	0	0	0	1(1)	0	3(2)
papiloma	0	0	0	1(1)	1(1)	1(1)

TABELA 6. ASPECTOS MICROSCÓPICOS DA LÍNGUA DE RATOS NORMAIS (N) E SIALOADENECTOMIZADOS (S) TRATADOS COM 4NQO DURANTE 6 MESES. ONDE SE OBSERVA A QUANTIDADE TOTAL DE ALTERAÇÕES ENCONTRADA. OS VALORES ENTRE PARENTÊSES REPRESENTAM O Nº DE RATOS AFETADOS. n=12

	N	S
modificação de papilas (aplainamento e hiperqueratose)	44(12)	65(12)
área de células disqueratóticas	20(12)	10(6)
D.F.A.* em área com carcinoma	8(4)	12(7)
D.F.A.* em área sem carcinoma	16(9)	18(8)
papiloma	3(3)	4(3)
carcinoma superficialmente invasivo	13(4)	6(5)
carcinoma com invasão muscular	3(3)	13(6)

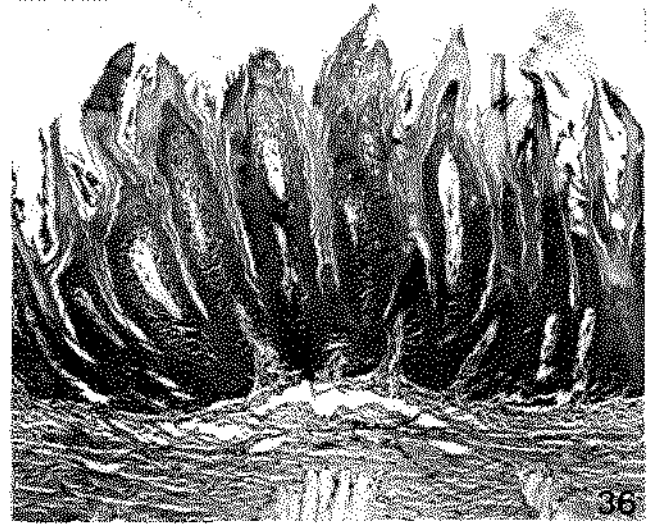
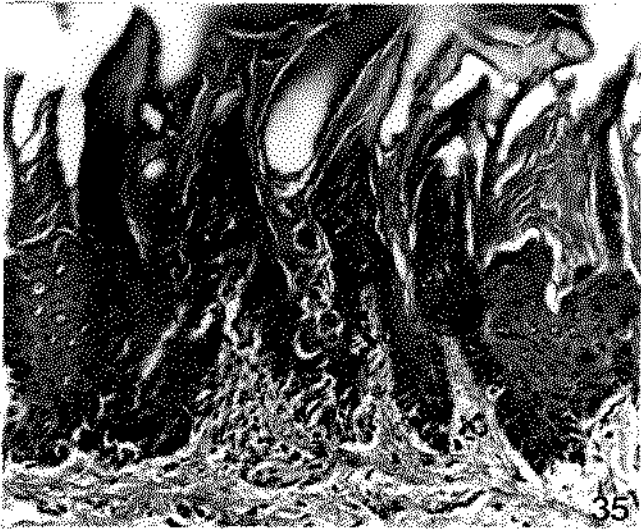
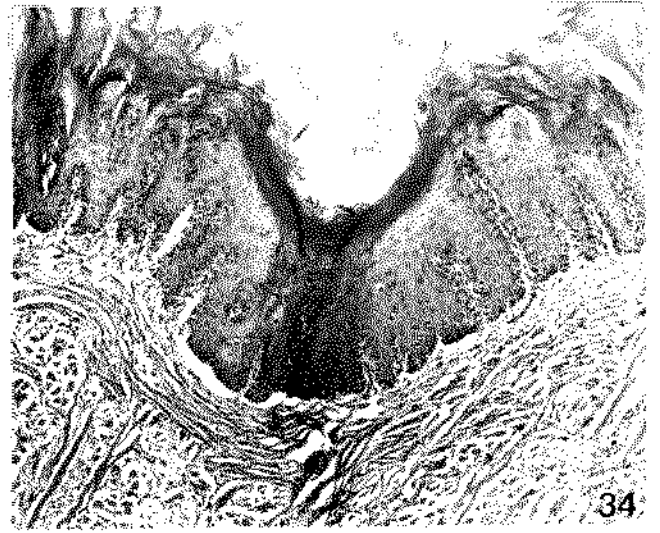
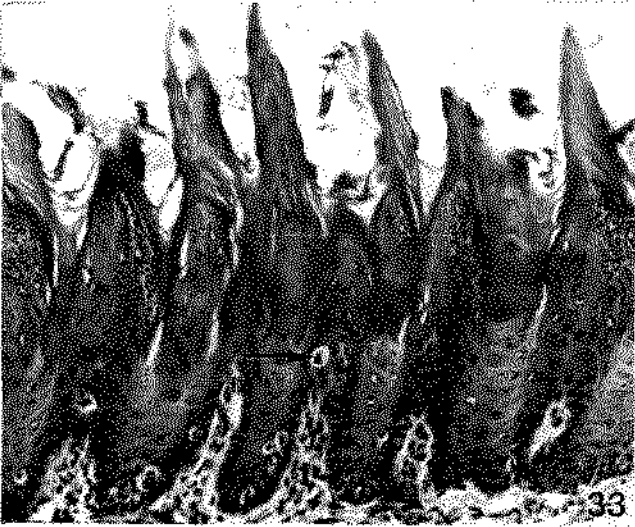
* Disqueratose Focal Acantolítica.

FIG.33-Mucosa do dorso da língua de rato normal após 1 mês de tratamento com 4NQO, exibindo típicas células disqueratóticas suprabasais hialinizadas e com halo claro circunjacente (seta) H&E 189 X.

FIG.34-Dorso da língua de rato xerostômico após 1 mês de tratamento com 4NQO, mostrando epitélio acantótico e hiperqueratinizado com aplainamento das papilas linguais H&E 75 X.

FIG.35-Dorso da língua de rato normal após 2 meses de tratamento com 4NQO, mostrando epitélio hiperqueratótico e células disqueratóticas (cabeças de seta) H&E 189 X.

FIG.36-Dorso da língua de rato xerostômico após 2 meses de tratamento com 4NQO, exibindo típica formação papilomatosa, composta por projeções epiteliais digitiformes suportadas por tecido conjuntivo frouxamente arranjado H&E 75 X.



FIGS. 37 e 38-Língua de rato normal após 3 meses de tratamento com 4NQD.

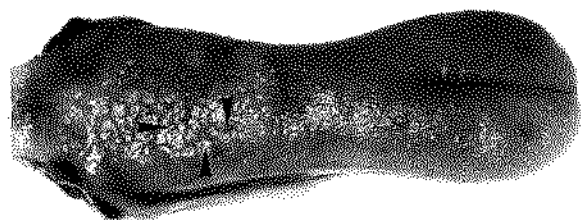
FIG. 37-Na região do tubérculo intermolar há atrofia de papilas (cabeças de seta) 3 X.

FIG. 38-Epitélio hiperqueratótico e levemente acantótico com aplainamento das papilas linguais na região do tubérculo intermolar H&E 189 X.

FIGS. 39 e 40-Língua de rato xerostômico após 3 meses de tratamento com 4NQD.

FIG. 39-Região de tubérculo intermolar com superfície de aspecto papilomatoso 3 X.

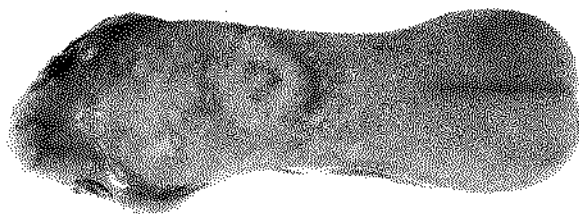
FIG. 40-Extensa área de disqueratose focal acantolítica com células acantolíticas soltas no interior de pequenas fendas epiteliais, desorganização da camada basal do epitélio H&E 189 X.



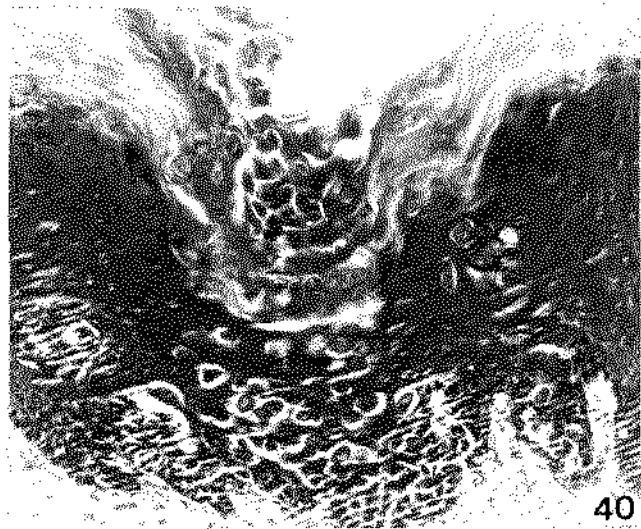
37



38



39



40

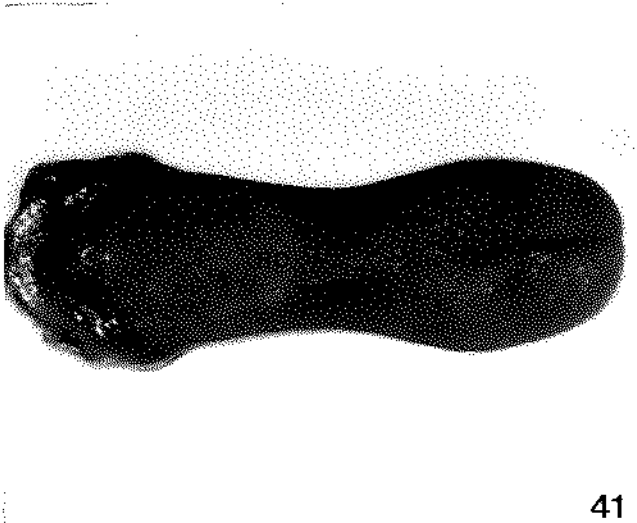
FIG.41-Língua de rato controle normal (período de 1 mês) para facilitar a comparação com as línguas alteradas.Os 2/3 anteriores estão recobertos por papilas cônicas simples e fungiformes; na região oval (RO) pelas papilas filiformes gigantes e na região do tubérculo intermolar (TI) pelas papilas filiformes verdadeiras. Na região posterior do tubérculo intermolar está presente a papila valada (PV) 3 X.

FIGS.42, 43 e 44-Língua de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQD 3 X.

FIG.42-Placas esbranquiçadas (cabecãs de seta) na região do tubérculo intermolar 3 X.

FIG.43-Área esbranquiçada e de aspecto papilomatoso (P) localizados no tubérculo intermolar 3 X.

FIG.44- Extensa hiperplasia, de leito vegetante e ulcerado 3 X.



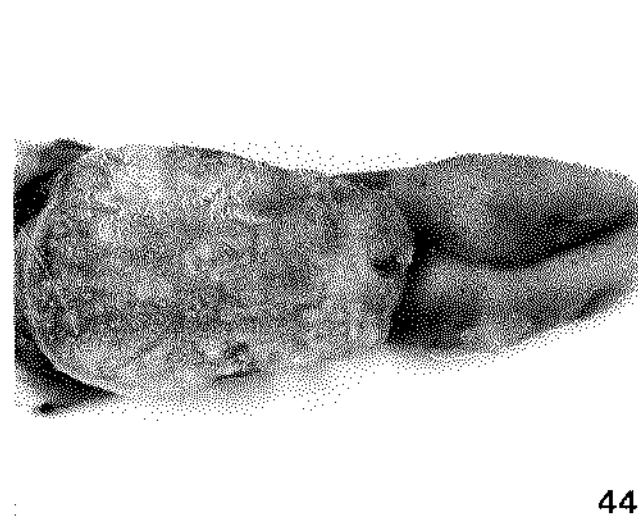
41



42



43



44

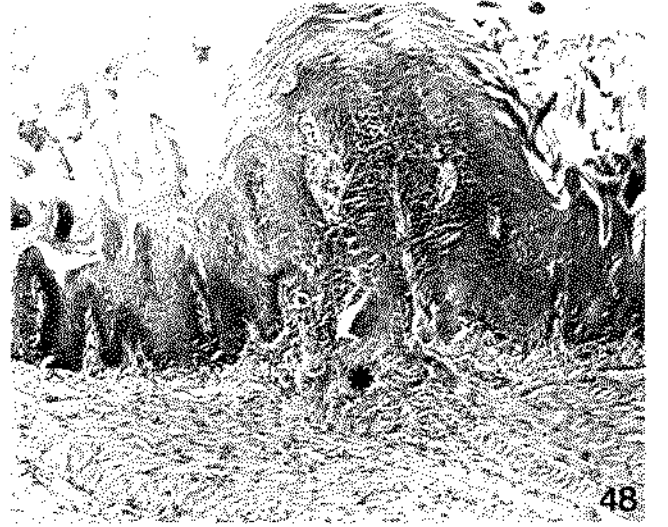
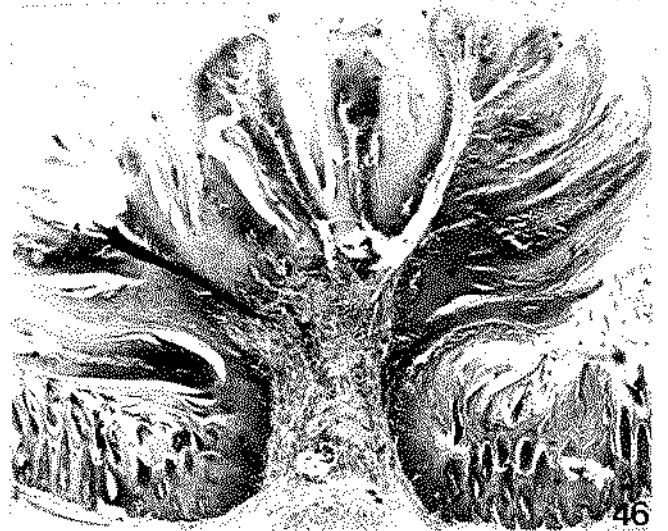
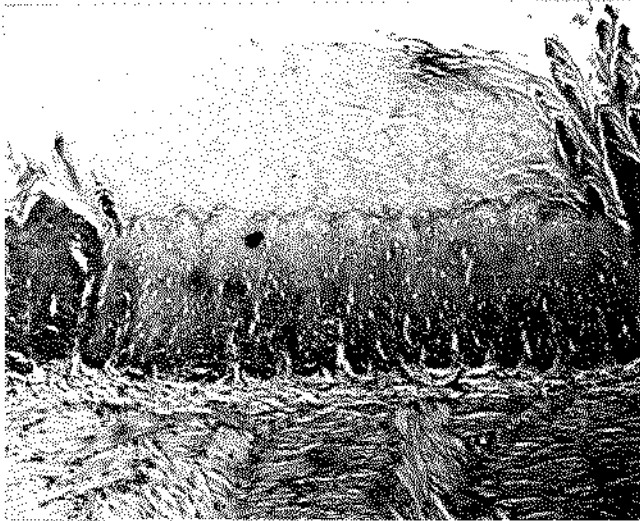
FIGS.45, 46, 47 e 48-Dorso da língua de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG.45-Epitélio com intensa hiperqueratose, acantose e aplainamento de papilas linguais H&E 75 X.

FIG.46-Papiloma benigno com projeções digitiformes e suporte de tecido conjuntivo H&E 30 X.

FIG.47-Células disqueratóticas distribuídas nas várias camadas do epitélio (seta) H&E 75 X.

FIG.48-Epitélio com displasia severa formando projeção na superfície e infiltrando no tecido conjuntivo subjacente (*) H&E 75 X.



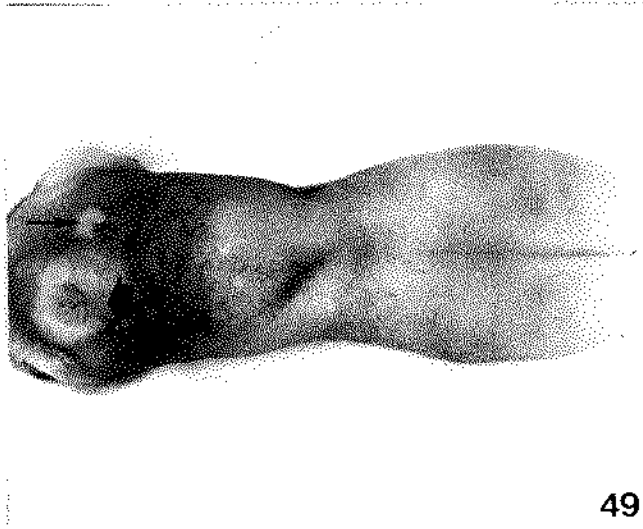
FIGS.49, 50, 51 e 52-Língua de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG.49-Placa esbranquiçada (seta) e pequena ulceração carcinomatosa com região central deprimida e bordas elevadas e esbranquiçadas (seta) 3 X.

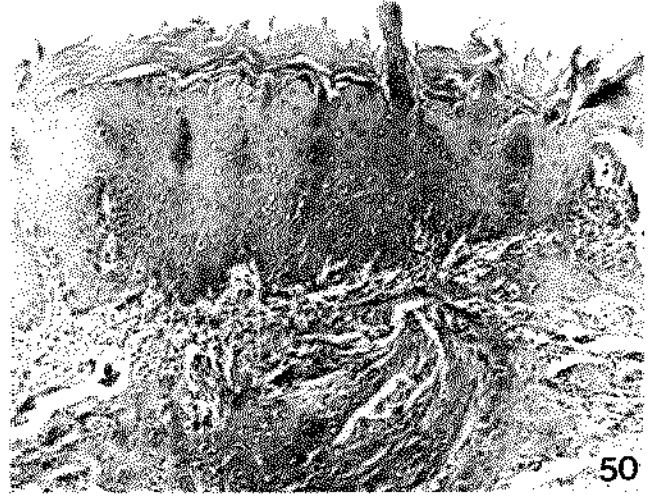
FIG.50-Epitélio hiperqueratinizado e acantótico com moderada displasia, localizado na periferia de ulceração carcinomatosa. No tecido conjuntivo subjacente observa-se massas de células neoplásicas se infiltrando pelo tecido muscular H&E 75 X.

FIG.51-Ilhas de células neoplásicas com atípias e pleomorfismo celular, entremeadas por moderado infiltrado inflamatório composto predominantemente de polimorfonucleares H&E 189 X.

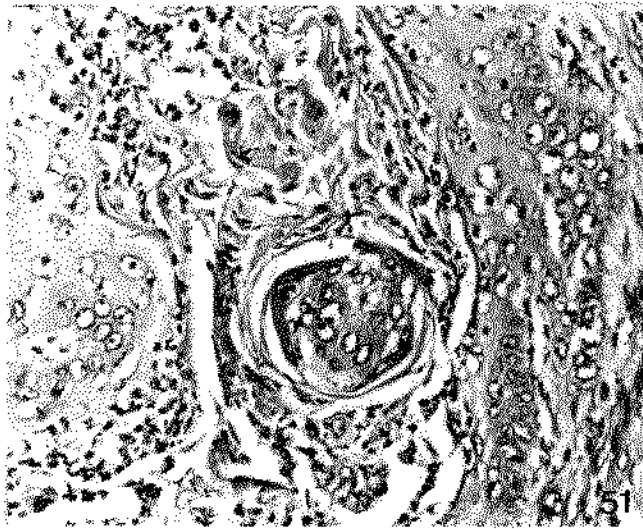
FIG.52-Maior aumento da figura anterior, mostrando células inflamatórias, pleomorfismo, atípias celulares e vacuolizações (seta) H&E 480 X.



49



50



51



52

FIGS. 53, 54, 55 e 56-Aspectos macroscópicos da língua de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO 3 X.

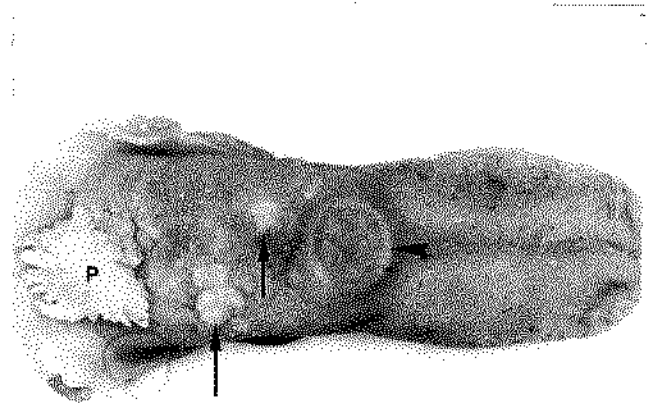
FIG. 53-Aspecto papilomatoso e áreas esbranquiçadas na região do tubérculo intermolar 3 X.

FIG. 54-Áreas esbranquiçadas (setas), papiloma (P) e pequena ulceração carcinomatosa de bordas ligeiramente elevadas e porção central deprimida (cabeça de seta) 3 X.

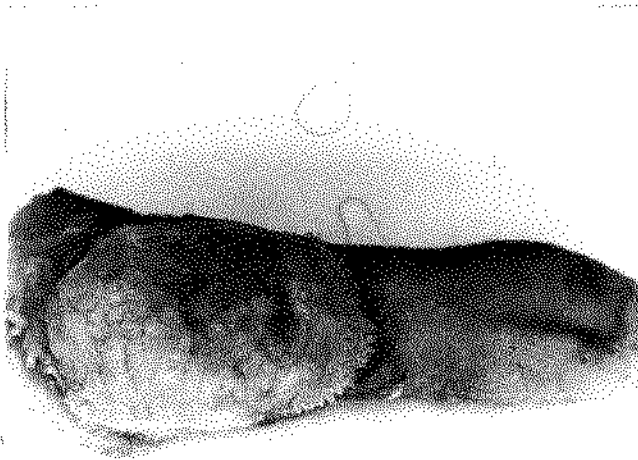
FIG. 55 e 56-Mucosa da língua de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO, mostrando na região do tubérculo intermolar grande ulceração carcinomatosa de aspecto vegetante e superfície digiforme 3 X.



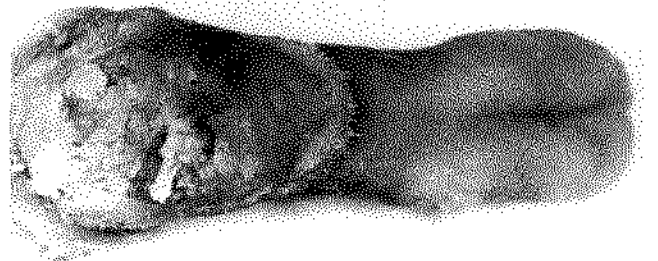
53



54



55



56

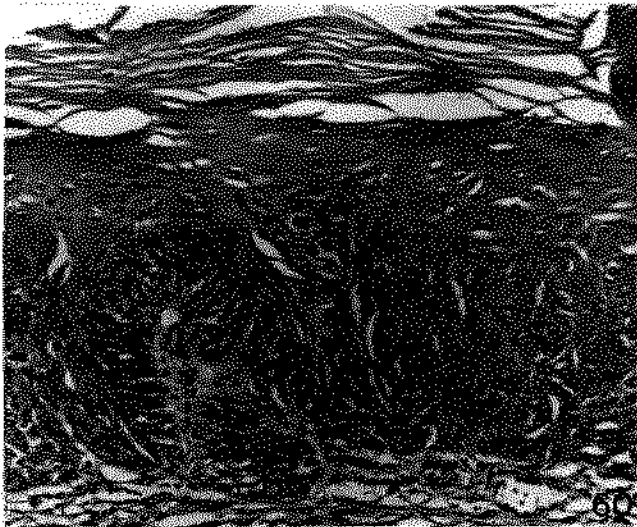
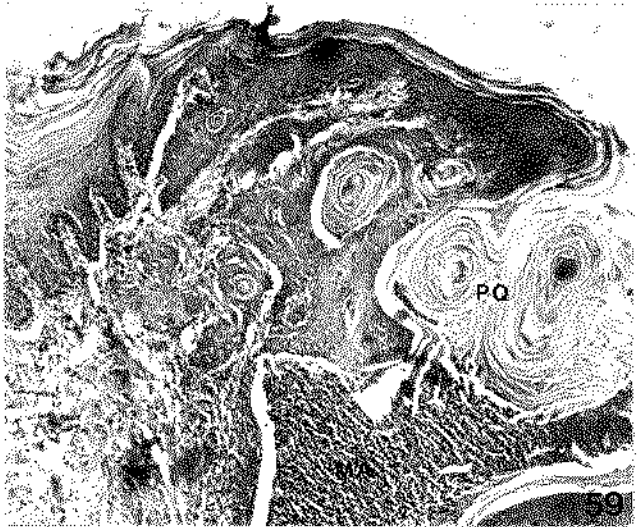
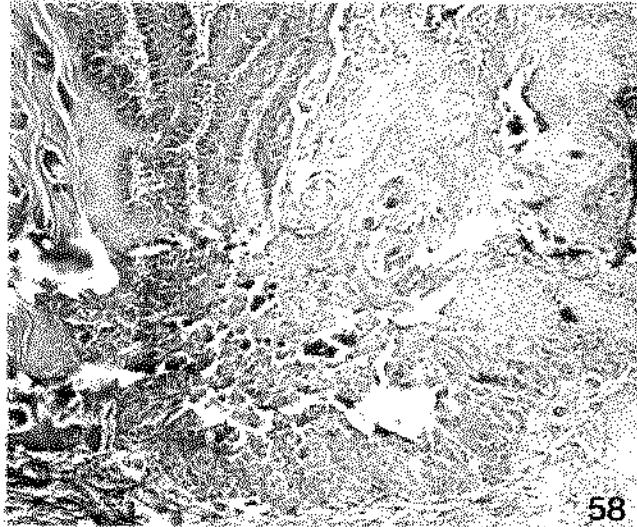
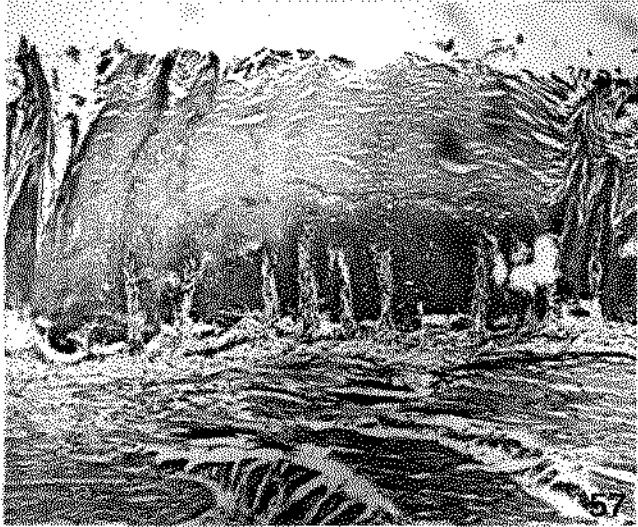
FIGS. 57, 58, 59 e 60-Aspectos microscópicos do dorso da língua de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG. 57-Hiperqueratose, acantose discreta e aplainamento das papilas linguais H&E 75 X.

FIG. 58-Cordões de células neoplásicas entremeadas por numerosas células disqueratóticas em meio ao tecido muscular H&E 75 X.

FIG. 59-Epitélio adjacente à ulceração carcinomatosa com hiperqueratose e acantose. Observa-se ainda parte da lesão neoplásica onde se verifica ilhas de células e pérolas de queratina (PQ) juntamente com microabscessos (MA) infiltrando-se pelo tecido muscular H&E 75 X.

FIG. 60-Epitélio hiperqueratótico com moderada displasia e aplainamento de papilas linguais. A membrana basal não está bem definida (*), dificultando a distinção entre as células epiteliais e as do tecido conjuntivo H&E 189 X.



ESTÔMAGO

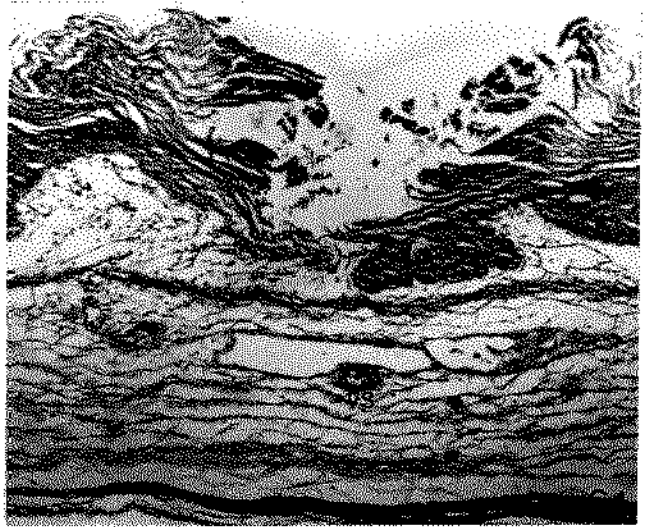
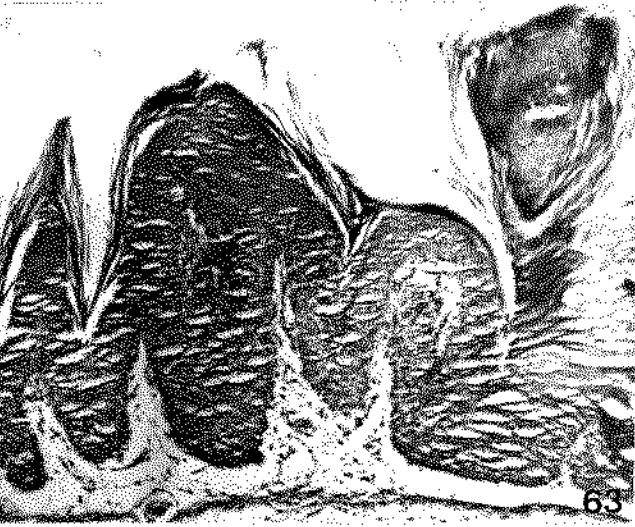
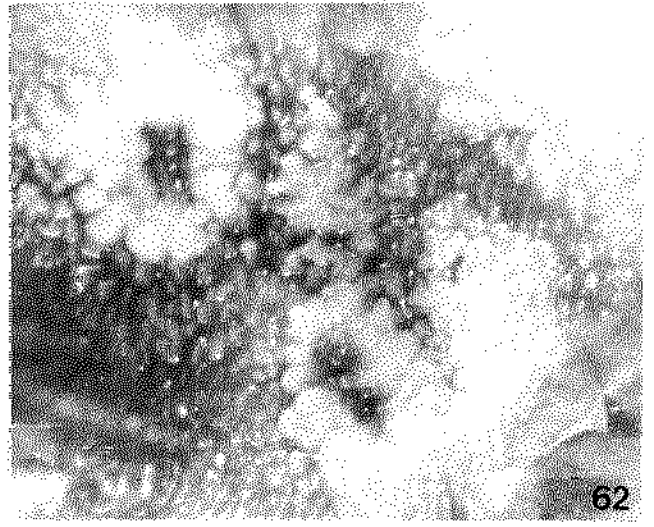
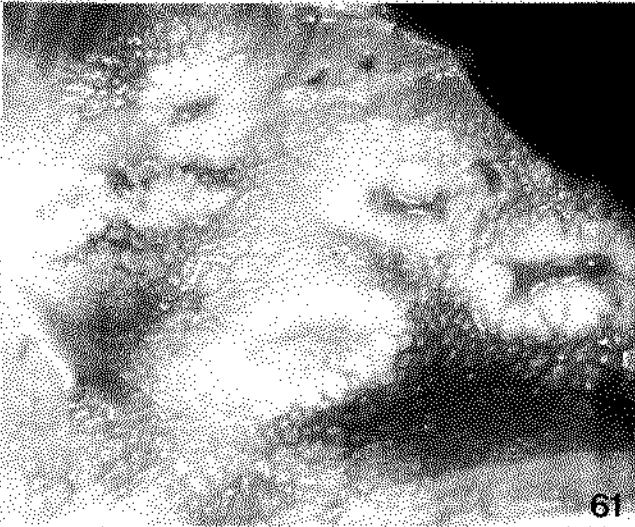
Na porção queratinizada do estômago de três ratos normais e cinco xerostômicos após 6 meses de tratamento com 4NQO apresentaram alterações circulares, de cerca de 4mm de diâmetro, com bordas elevadas e esbranquiçadas (figs.61 e 62). Observa-se também em quatro animais xerostômicos, projeções papilares e difusas por toda a mucosa queratinizada.

Microscopicamente, as áreas esbranquiçadas correspondiam a epitélio hiperqueratinizado e hiperplásico, enquanto que nas ulcerações o infiltrado inflamatório era discreto (fig.63 e 64).

FIGS. 61 e 62 - Mucosa do estômago de rato normal (fig. 61 5 X) e xerostômico (fig. 62 10 X) 6 meses após tratamento com 4NQO no palato, mostrando ulcerações circulares com bordas elevadas, esbranquiçadas e papilomatosas.

FIG. 63 - Mucosa de estômago de rato normal após 6 meses de tratamento com 4NQO, adjacente à região ulcerada, mostrando epitélio hiperplásico H&E 96 X.

FIG. 64 - Mucosa de estômago de rato xerostômico após 6 meses de tratamento com 4NQO, mostrando epitélio hiperplásico, acantótico e ulcerado com presença de discreto infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos (VS) abaixo da úlcera H&E 75 X.



LINFONODOS CERVICAIS

No grupo de 6 meses os linfonodos cervicais foram removidos e pesados, levando-se em consideração a presença de ulcerações na língua (tab. 7). Nos xerostômicos o peso dos linfonodos foi maior do que nos normais, com valores mais acentuados quando da presença de ulcerações na língua.

Microscopicamente os linfonodos de ratos controles apresentam-se normais com arquitetura típica observando-se a zona cortical contendo folículos linfáticos, cápsula fibrosa com vasos sanguíneos, seio subcapsular e região dos vasos linfáticos eferentes (hilo) bastante nítidos (figs. 66, 67 e 68). Os linfonodos dos ratos normais e xerostômicos com carcinoma apresentaram espaçamentos entre as células do parênquima, desorganização da arquitetura normal e grandes vasos sanguíneos ingurgitados de hemácias (fig. 70 e 72). Em nenhum dos linfonodos foi observada metástase.

TABELA 7. MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DO PESO EM GRAMAS DE LINFONODOS CERVICAIS REMOVIDOS 6 MESES APÓS APLICAÇÃO DE 4NQO. n=50

	SEM ULCERAÇÃO DE LÍNGUA	COM ULCERAÇÃO DE LÍNGUA
NORMAIS	0,052 ± 0,02	0,056 ± 0,02
XEROSTÔMICOS	0,098 ± 0,03	0,139 ± 0,05

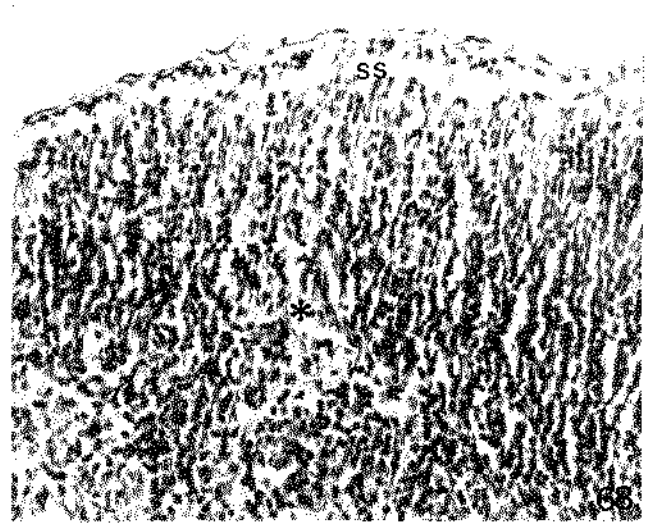
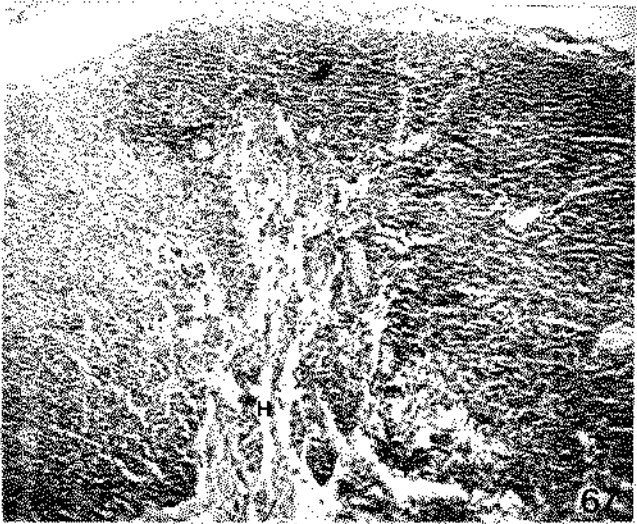
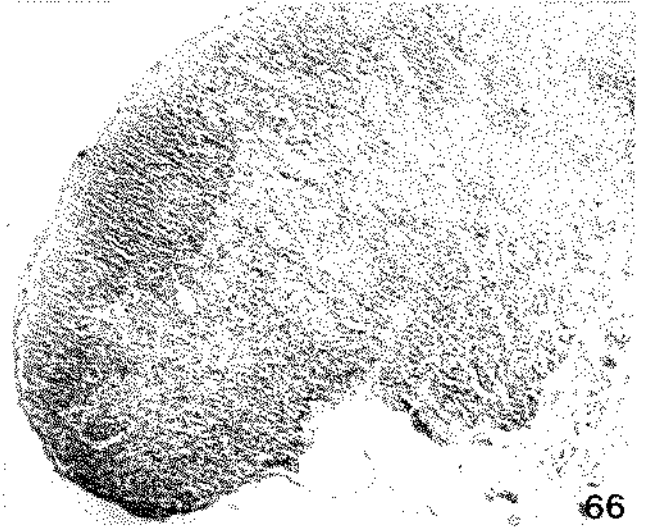
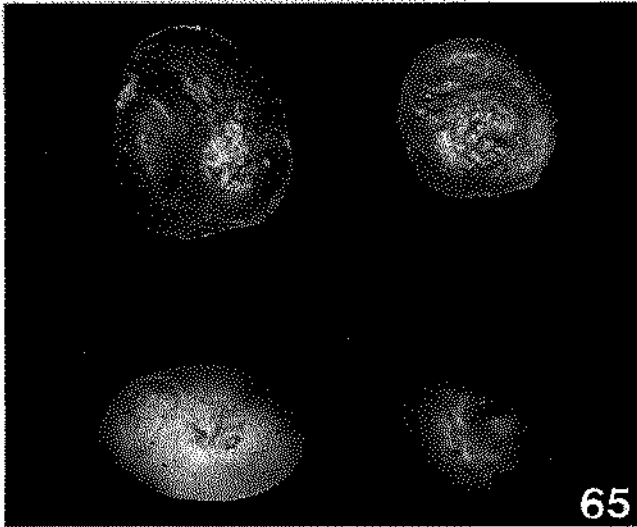
FIG.65-Linfonodos cervicais de ratos sem ulceração de língua após 6 meses de aplicação de 4NQO. Os dois superiores são de rato xerostômico, os quais são maiores do que os da porção inferior, pertencentes a ratos normais 5 X.

FIGS.66, 67 e 68-Aspectos microscópicos de linfonodo de rato controle (6 meses).

FIG.66-Arquitetura normal preservada em que se observa estroma, seio subcapsular, região cortical e hilo H&E 30 X.

FIG.67-Região dos vasos linfáticos aferentes (H) e arquitetura compatível com a normalidade H&E 75 X.

FIG.68-Região cortical onde se observa a presença do seio subcapsular (SS) no estroma de tecido conjuntivo e menos evidentes no parênquima celular (*) H&E 189 X.



FIGS. 69 e 70-Linfonodos de ratos normais após 6 meses de tratamento no palato com 4NQO.

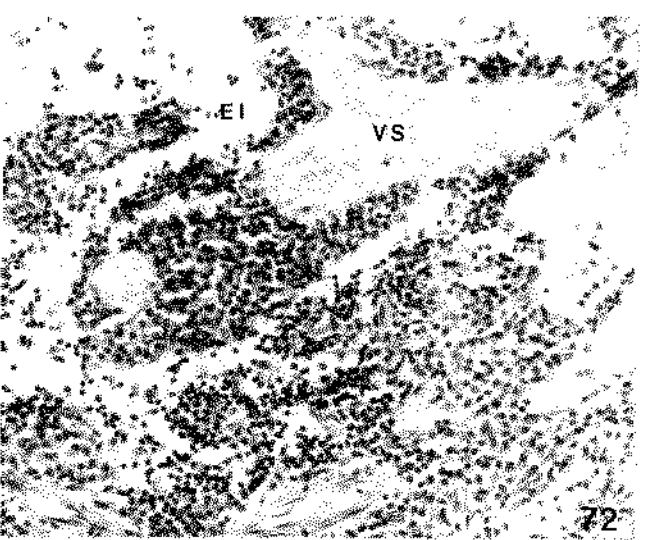
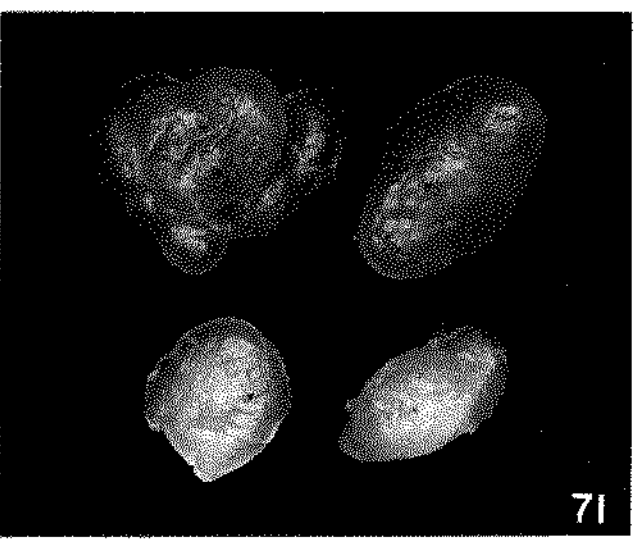
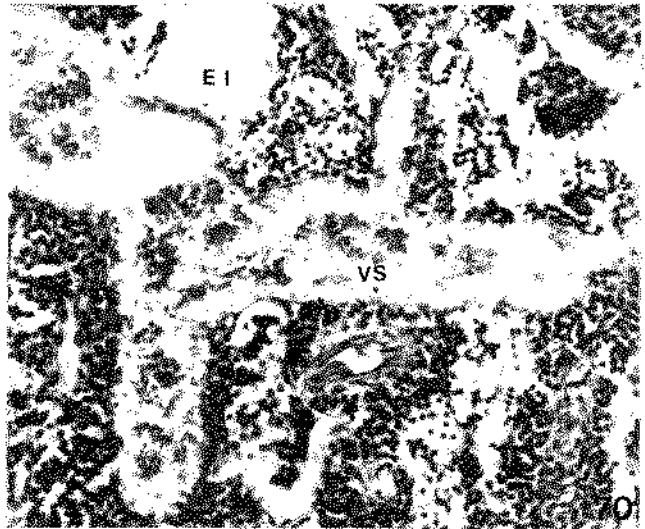
FIG.69-Os dois da porção superior pertencem a rato que desenvolveu ulceração extensa na língua, sendo os outros dois pertencentes a rato sem ulceração 5 X.

FIG.70-Grandes espaços intercelulares (EI) e vaso sanguíneo (VS) ingurgitado de hemácias H&E 189 X.

FIGS.71 e 72-Linfonodos de ratos xerostômicos após 6 meses de tratamento com 4NQO.

FIG.71-Os dois da porção superior pertencem a rato que desenvolveu ulceração extensa de língua, os outros dois da porção inferior pertencem a rato sem ulceração 5 X.

FIG.72-Grande vaso sanguíneo (VS) contendo hemácias, além de espaços intercelulares (EI) amplos H&E 189 X.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Nas duas últimas semanas do experimento, os ratos xerostômicos do grupo de 6 meses, exibiram emagrecimento acentuado, tornando-se menos ativos. Isto provavelmente ocorreu em função das ulcerações bucais provocarem dificuldades para a alimentação, o que também foi descrito por WALLENIUS & LEKHOLM (1973), LEKHOLM & WALLENIUS (1976), WONG & WILSON (1983) e STEIDLER e cols. (1984).

Optou-se neste trabalho pela obtenção da xerostomia através da sialoadenectomia das glândulas salivares maiores, por ser método simples, bastante confiável e que reduz acentuadamente e de forma permanente o fluxo salivar, o que não ocorre quando se emprega métodos farmacológicos (WALLENIUS, 1966; LEKHOLM & WALLENIUS, 1976; FISKER, 1990).

Segundo FISKER (1990), o rato da variedade Wistar é menor, de fácil manuseio, apresenta maior longevidade (2,5 a 3 anos), baixo índice de mortalidade e menos doenças intercorrentes quando comparado ao Sprague-Dawley. No entanto, por razões que não conhecemos, quase todos os estudos de carcinogênese experimental foram realizados em ratos Sprague-Dawley. Em apenas dois (PHILIPSEN & FISKER, 1983; FISKER, 1990) foi utilizado ratos Wistar, o que nos levou a supor inicialmente que esta variedade pudesse ser mais resistente à ação de carcinógenos químicos. Por esta razão a frequência de aplicação neste trabalho foi de 4 vezes por semana, enquanto que na maioria dos trabalhos é de 3 vezes por semana, de

acordo com o modelo preconizado em 1973 por WALLENIUS & LEKHOLM. O rato Wistar mostrou-se susceptível à ação do 4NQO e adequado para este modelo experimental.

Autores como WONG & WILSON (1983), PHILIPSEN & FISKER (1983) e FISKER (1990), realizaram as aplicações de carcinógeno com os animais anestesiados, no entanto, FISKER (1990) considera vantagem trabalhar com animais não anestesiados. Anestésias sucessivas acarretam o risco de complicações sistêmicas que podem causar morte do animal.

Nos estudos de WHITE e cols. (1981) as neoplasias surgiram em hamsters após doze semanas de aplicação de DMBA. No estudo de LEKHOLM & WALLENIUS (1976), observações macroscópicas sugestivas de malignidade foram observadas em ratos com secreção salivar inibida farmacologicamente após vinte semanas de tratamento com 4NQO. Utilizando camundongos, notou-se a presença de carcinomas de células escamosas invasivos e bem diferenciados após dezesseis semanas de aplicação de 4NQO (STEIDLER & READE, 1986). Portanto, hamsters e camundongos parecem ser mais susceptíveis à ação de carcinógenos químicos do que ratos. O DMBA é hidrocarboneto policíclico solúvel em óleo, enquanto o 4NQO é amina aromática solúvel em água, o que poderia explicar a maior efetividade do 4NQO. A hidrossolubilidade deve facilitar a difusão do 4NQO através da película de saliva que recobre a mucosa bucal, enquanto que, o DMBA seria facilmente deglutido, permanecendo menos tempo em contato com a mucosa bucal dos animais (EVESON, 1981). Além disso, é relevante o tipo de epitélio, o DMBA é bastante efetivo na bochecha de hamsters, na qual existem apenas cerca de três a quatro camadas de células, o epitélio

não é queratinizado e permite a penetração de substâncias químicas (SALLEY, 1954; WHITE e cols., 1981). O epitélio da mucosa bucal dos ratos é pavimentoso estratificado queratinizado. O 4NQO 0,5% em propilenoglicol, é a diluição mais empregada, mas diversas concentrações de carcinógenos foram testadas, verificando-se que esta é a mais adequada. Em excesso (1,5%) pode causar mortes de animais, e em concentrações muito baixas como 0,1% não é efetiva, são usados para o DMBA outros solventes, mas a concentração usada é de 0,5% (MORRIS, 1961).

O 4NQO aplicado durante 6 meses provavelmente atuou 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). É de fundamental importância a frequência de aplicação do carcinógeno e o tempo de permanência do mesmo em contato com a mucosa (SVENSSON & HEYDEN, 1982). Por esta razão, o 4NQO foi aplicado quatro vezes por semana e, após cada aplicação os animais permaneceram 5 horas sem beber água.

Os ratos normais após dois meses de aplicação de 4NQO não apresentaram alterações da mucosa bucal, entretanto estas ocorreram em todos os outros grupos. As alterações observadas no palato em ordem crescente de severidade foram mucosa de aspecto esbranquiçado, perda de definição das rugosidades palatinas, aspecto papilomatoso e ulceração deformante com eventual mobilidade dentária (WALLENIUS, 1966; WALLENIUS & LEKHOLM, 1973; LEKHOLM & WALLENIUS, 1976; SVENSON & HEYDEN, 1982). Leucoplasias seguidas por numerosos crescimentos papilares e irregulares no palato, e áreas tumorais adjacentes aos

molares (WALLENIS, 1966; FISKE, 1990) foram também constatadas neste trabalho. Observou-se ainda, que as alterações mais acentuadas ocorreram predominantemente nos ratos xerostômicos; que também foram afetados em maior número. Estes dados confirmam claramente a ação protetora da saliva na carcinogênese, ou seja, ela não impede, mas dificulta a atuação do 4NQO, retardando o aparecimento das neoplasias malignas. Os animais xerostômicos apresentaram lesões mais severas em todos os períodos porque provavelmente se iniciaram precocemente em relação aos normais. Deve-se ressaltar, no entanto, que em ambos os grupos as características histológicas foram semelhantes.

As lesões de língua ocorreram principalmente na região do tubérculo intermolar porque, embora o 4NQO tivesse sido aplicado somente na mucosa palatina, fisiologicamente, existe contato intenso entre o tubérculo intermolar e a maxila na região intermolar (KUTUZOV & SICHER, 1951; KUTUZOV & SICHER, 1952; MATTHEWS e cols., 1986). Alterações não se desenvolveram na porção anterior do dorso da língua, e isto pode ser devido à existência de espaços interpapilares recobertos por queratina, que mecanicamente é mais resistente do que aquela que recobre a extremidade das papilas. Os espaços e a queratina interpapilar estão ausentes na região do tubérculo intemolar (KUTUZOV & SICHER, 1951). Lesões de língua e na região intermolar da maxila ocorreram 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 entretando não é frequente no homem..

No dorso da língua, as lesões iniciais eram representadas macroscopicamente por mucosa esbranquiçada e áreas sugestivas de atrofia de papilas; evoluindo eventualmente para papilomas. Talvez devido à falta de vascularização adequada e à velocidade de crescimento, os papilomas sofriam necrose, deixando pequenas ulcerações de bordas elevadas e porção central deprimida. Estas rapidamente se desenvolviam originando ulcerações de leito exofítico e superfície vegetante com projeções digitiformes. Sequência semelhante de evolução foi descrita por vários autores (WALLENIIUS, 1966; WALLENIIUS & LEKHOLM, 1973; LEKHOLM & WALLENIIUS, 1976; WALLENIIUS e cols., 1979; STEIDLER & READE, 1984; PRIME e cols., 1986).

Na maioria dos estudos de carcinogênese, e também neste, as manifestações clínicas iniciais tanto de língua como de palato, eram de caráter exofítico, como por exemplo a presença de papilomas (STORMBY & WALLENIIUS, 1964; WALLENIIUS, 1966; LEKHOLM & WALLENIIUS, 1976; FREEDMAN e cols., 1978; MAREFAT e cols., 1979; WHITE e cols., 1981; WONG & WILSON, 1983; ODUDOYA & SHKLAR, 1984). Após oito semanas de aplicação de 4NQO no palato de camundongos, STEIDLER & READE (1984) observaram que a mucosa apresentava textura micronodular, o que foi constatado neste trabalho e denominado de aspecto papilomatoso, caracterizado microscopicamente por áreas de hiperplasia epitelial ou mesmo de papilomas ainda em estágio inicial de desenvolvimento.

Na língua havia áreas de modificações de papilas 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 FISKER e cols. (1990), o resultado da aplicação de 4NQO no palato foi hiperqueratose, considerado como um estágio precoce no processo de carcinogênese. De acordo com FISKER e cols. (1990), o grau de hiperplasia epitelial aumenta progressivamente com o tempo de aplicação do carcinógeno e, os parâmetros usados por este autor indicaram diferenças entre a hiperplasia provocada pelo 4NQO em relação a outras drogas essencialmente hiperplasiogênicas, como por exemplo a terpentina.

A literatura mostra que lesões bilaterais no palato ocorrem em estágios avançados de carcinogênese. Neste trabalho a maioria das ulcerações em ratos xerostômicos eram bilaterais, indicando que o processo estava mais adiantado em relação aos normais. Além disso, quando as ulcerações presentes eram bastante extensas (mais de 5mm de diâmetro), causaram deslocamentos das coroas dentais e mobilidade dental, como descrito por PRIME e cols. (1983) e WALLENIUS & LEKHOLM (1973). Os deslocamentos dentais e as reabsorções ósseas por invasão tumoral ocorreram em maior número e em maior gravidade em ratos xerostômicos.

Neste trabalho as lesões habitualmente se originaram de um dos lados do palato, e à medida em que evoluiu e se desenvolveu, pode-se visualizar lesões em ambos os lados. Como nos ratos normais as alterações ainda eram iniciais em relação aos xerostômicos, as mesmas por consequência, eram unilaterais, ocorrendo o inverso para os ratos xerostômicos. Existem estudos, mostrando comprometimento gengival, com a formação de bolsa periodontal (LEKHOLM & WALLENIUS,

1976; WONG & WILSON, 1983; PRIME e cols., 1983; PRIME e cols., 1986).

Tanto no palato como na língua dos ratos normais e xerostômicos, observou-se áreas com células disqueratóticas, as quais poderiam ser consideradas precursoras de uma alteração mais severa denominada disqueratose focal acantolítica. O padrão histológico é tradicionalmente associado ao da doença de Darier em humanos, tendo evolução discutível. Ambas as lesões ocorreram em maior número nos ratos xerostômicos; evidenciando que a redução do fluxo salivar favorece o desenvolvimento destas alterações frente ao estímulo carcinogênico proporcionado pelo 4NQO. As células disqueratóticas, pareciam se originar de uma ou duas células do compartimento proliferativo, migrando através do epitélio e se hialinizando gradualmente, até atingir a camada córnea e eventualmente serem esfoliadas. Realmente, visualizava-se células hialinizadas enfileiradas por toda a espessura do epitélio, sugerindo provável origem na mesma célula da camada basal, que poderia ter sofrido transformação pelo carcinógeno, apresentando portanto, algum tipo de mutação. Estas suposições necessitam de maiores esclarecimentos mediante estudo com técnicas mais adequadas e sensíveis como a imunohistoquímica. O aparecimento destas células foi observado também por PHILIPSEN & FISHER (1983) e PRIME e cols. (1986) no mesmo modelo animal.

Após dois meses de tratamento com 4NQO, observou-se em ratos xerostômicos maior número de células disqueratóticas em relação aos normais, sendo que após três meses, os normais mostraram maior número destas áreas. Por outro lado, após três meses havia

numerosas áreas de disqueratose focal acantolítica nos animais xerostômicos.

Na língua de ratos xerostômicos após três meses de aplicação de 4NQO houve diminuição do número de áreas de células disqueratóticas e aumento do número de áreas de disqueratose focal acantolítica. Portanto, no palato e língua dos ratos, do segundo para o terceiro mês de aplicação de 4NQO, verificou-se diminuição do número de áreas de células disqueratóticas, no entanto, isto talvez ter sido compensado pelo aumento do número de áreas de disqueratose focal acantolítica.

As áreas de disqueratose focal acantolítica de palato e língua não podiam ser distinguidas macroscopicamente. No estudo de PHILIPSEN & FISKEK (1983) a mucosa dos animais foi meticulosamente examinada em intervalos regulares durante o período experimental e, as áreas de disqueratose focal acantolítica também não puderam ser vistas macroscopicamente. Como no presente trabalho, durante aplicação contínua de 4NQO, FISKEK (1990) verificou áreas de disqueratose focal acantolítica em grande número após oito semanas; demonstrando todos os padrões característicos da disqueratose em humanos. Sugere-se que a disqueratose focal acantolítica represente maturação epitelial induzida, ou um distúrbio de diferenciação celular causado pela variedade de estímulos proporcionados pelos carcinógenos químicos (FISKEK, 1990; PHILIPSEN & FISKEK, 1983). A disqueratose focal acantolítica é uma alteração epitelial que na maioria dos estudos de carcinogênese experimental precede o desenvolvimento de carcinomas, sendo caracterizada pela formação de fendas suprabasais, células acantolíticas e disqueratóticas,

hiperqueratose, paraqueratose e hiperplasia da camada basal (PHILIPSEN & FISHER, 1983; WONG & WILSON, 1983; PRIME e cols., 1986). A hipótese da disqueratose focal acantolítica ser ou não cancerizável ainda é discutível.

Neste trabalho observou-se a presença de áreas de disqueratose focal acantolítica em tecido neoplásico, sugerindo que os carcinomas se desenvolveram em algumas áreas de disqueratose preexistentes por casualidade, ou então que estas áreas reacionais do epitélio favoreceram o desenvolvimento de carcinomas e, portanto, sejam cancerizáveis de fato. O modelo estabelecido por WALLENIUS & LEKHOLM (1973) pode ser interessante para os estudos da disqueratose focal acantolítica.

Analisando as alterações palatinas, considerou-se carcinoma superficialmente invasivo as neoplasias que invadiam discretamente a lâmina própria, o qual pode ser considerado um intermediário entre o carcinoma "in situ" e o carcinoma francamente invasivo. Foram considerados carcinomas de células escamosas invasivos com comprometimento ósseo, apenas aquelas lesões em que efetivamente ocorreu reabsorção óssea em função da invasão tecidual pelas células neoplásicas ou pela presença de intenso infiltrado inflamatório.

Não foi possível neste estudo, analisar a causa da reabsorção óssea, podendo ter ocorrido por proliferação de tecido neoplásico ou pela presença de células inflamatórias. Tem sido descrito que as aplicações iniciais de 4NQO induzem o aparecimento de células inflamatórias. Através de marcadores imunológicos observou-se que o número de células dendríticas, macrófagos e linfócitos aumentam à medida em que se prolonga o tratamento com

4NQO (MATTHEWS e cols., 1988; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1989). Em alguns casos observou-se que as ilhas de células malignas estavam a certa distância do tecido ósseo, no entanto, havia entre ambos grande quantidade de células inflamatórias do tipo mononuclear que poderiam ser efetivamente as responsáveis por parte da destruição óssea. Deve-se considerar que a reabsorção óssea é mediada por osteoclastos.

Em relação às lesões de língua, a alteração mais inicial foi representada por hiperqueratose, e ratos normais após um mês de tratamento com 4NQO, exibiram aspecto microscópico compatível com a normalidade. Por outro lado, a lesão mais grave observada foi carcinoma francamente invasivo que se infiltrava e destruía o tecido muscular, deixando evidente o maior comprometimento dos tecidos nos ratos xerostômicos.

As lesões malignas de palato, e língua, de ambos os grupos, eram carcinomas de células escamosas altamente diferenciados, com presença de grande quantidade de pérolas de queratina. Após seis meses de aplicação de 4NQO, houve diminuição das áreas de disqueratose focal acantolítica nos sialoadenectomizados em relação aos normais, e tal fato é explicável pela presença de numerosas áreas de carcinoma com invasão óssea e muscular, tanto em palato como em língua. De acordo com PRIME e cols. (1983), nos carcinomas de língua as pérolas eram maiores e mais numerosas em relação aos carcinomas de palato. Foram encontradas características típicas de carcinoma como queratinização individual de células, poucas mitoses atípicas, hiperchromatismo, pleomorfismo nuclear, áreas de necrose, microabscessos e destruição

de tecidos subjacentes como o osso no palato e o músculo na língua.

A lâmina própria do palato e da língua com alterações carcinomatosas mostrava intenso infiltrado inflamatório crônico de células mononucleares, fato também observado por PRIME e cols. (1983), que relatou também a presença de eosinófilos junto a macrófagos e linfócitos (EVESON & Mac DONALD, 1977; PHILIPSEN & FISHER, 1983; ODUKOYA & SHKLAR, 1984).

Nos estudos de SALLEY (1954) e WHITE e cols. (1981), a primeira manifestação após as aplicações de DMBA em hamsters foi intensa reação inflamatória com eventual secreção purulenta. Tal fato não foi neste trabalho observado. Ao exame microscópico do palato de alguns animais normais e xerostômicos após 6 meses de aplicação de 4NQO, constatou-se a presença de microabscesso intraepitelial, como no trabalho de WONG & WILSON (1983). Isto demonstra uma resposta inflamatória ao 4NQO em ratos, ou a possíveis infecções secundárias por microrganismos num epitélio já alterado morfológicamente.

Ulcerações foram mais frequentes na mucosa do estômago de ratos xerostômicos em relação aos ratos normais, provavelmente devido à deglutição do 4NQO sem sofrer diluição pela saliva. O aparecimento de carcinomas de estômago foi observado em outros trabalhos (WALLENIUS, 1966; WALLENIUS & LEKHOLM, 1973; STEIDLER & READE, 1984).

Os linfonodos dos ratos xerostômicos com ulcerações extensas de língua apresentaram volume bastante aumentado, sendo que os linfonodos de ratos xerostômicos sem ulceração em relação aos linfonodos de ratos normais também sem evidências de carcinoma, se

mostraram mais volumosos, o que talvez seja explicável pela maior concentração de microrganismos na boca de ratos xerostômicos (JORGE, 1991). Microscopicamente observou-se que linfonodos com espaços vasculares aumentados e hiperêmicos; observou-se extensos espaços intercelulares e eventuais vacuolizações, o que pode ser atribuído à inflamação infecciosa decorrente de microrganismos presentes na lesão de boca, visto que não foram encontradas metástases.

Assim como neste trabalho, PRIME e cols. (1983) e STEIDLER & READE (1984) não observaram qualquer evidência de metástases em seus estudos de carcinogênese. WALLENIUS (1966) mediante aplicações de DMBA em ratos com inibição de secreção salivar e remoção das glândulas salivares maiores, observou que dos 28 animais, somente um exibiu metástase em linfonodo cervical. Por outro lado, SHINGAKI e cols. (1987) observaram em hamsters metástase em 26,1% dos que também receberam cortisona.

Maior número de animais sialoadenectomizados mostraram carcinoma invasivo, comprometendo tecido ósseo subjacente ou tecido muscular. Portanto, este trabalho confirma a ação protetora da saliva no processo de carcinogênese induzido pelo 4NQO. A saliva pode atuar como barreira mecânica, dificultando a penetração e o contato do carcinógeno com o epitélio bucal. A própria diluição do 4NQO pela saliva e a deglutição devem ser fatores relevantes (KRESHOVER & SALLEY, 1957). Sabe-se que a inibição da secreção salivar de ratos, aumenta a absorção de drogas pela mucosa bucal em 20% (DEAN & HIRAMOTO, 1986). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor determinação dos mecanismos envolvidos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Com base nos seguintes dados:

- 1) Observou-se maior número de ratos xerostômicos com alterações de palato e língua nos períodos de 2, 3 e 6 meses em relação aos normais.
- 2) Microscopicamente o palato de ratos xerostômicos após 2, 3 e 6 meses apresentou maior número de alterações que variaram desde células disqueratóticas a carcinoma com invasão óssea.
- 3) Microscopicamente a língua de ratos xerostômicos em todos os períodos experimentais mostrou aumento do número de alterações que variaram de aplainamento e hiperqueratose papilar até carcinoma com invasão muscular.
- 4) Nos ratos sialoadenectomizados as alterações encontradas foram mais severas e numerosas do que nos normais.

Concluiu-se que a saliva das glândulas salivares maiores do rato, dificulta e retarda o desenvolvimento dos carcinomas e das alterações que o precedem em ratos tratados com 4NQO no palato.

RESUMO

RESUMO

Ratos normais e sialoadenectomizados receberam aplicações tópicas de óxido de nitroquinolina (4NQO) a 0,5% em propilenoglicol no palato, quatro vezes por semana, durante um, dois, três e seis meses. Macroscopicamente o palato apresentou esbranquiçamento, perda de definição das rugosidades, aspecto papilomatoso e ulcerações deformantes com mobilidade dentária. Na língua, pode-se verificar atrofia de papilas, papilomas e ulcerações. Microscopicamente foram observadas alterações na queratinização, presença de disqueratose focal acantolítica, e carcinomas superficial e profundamente invasivos. Tanto no palato como na língua, as alterações foram mais precoces e mais intensas nos sialoadenectomizados; indicando que a secreção das glândulas salivares maiores tem efeito protetor no desenvolvimento da carcinogênese bucal provocada pelo 4NQO.

SUMMARY

SUMMARY

Normal and sialoadenectomized Wistar rats treated on the palate with 4-nitroquinoline oxide 0,5% in propyleneglicol four times weekly during 1, 2, 3 and 6 months. Macroscopically the palate showed whitish aspect, loss of rugosities definition, papillomatous projections and ulcerations with dental mobility. The dorso of the tongue presented papillae atrophy, papillomas and ulcerations. The main microscopical features were hiperqueratosis, focal acantolytic dyskeratosis and differentiated squamous cell carcinoma. Either on the palate and the tongue the alterations were more pronounced and numerous on sialoadenectomized rats indicating that secretion of the major salivary glands are effective to protect the oral mucosa of the rat of the effects of the carcinogen 4-nitroquinoline-oxide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, F.F. Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 1981: 105: 3.

- 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.

- BINNIE, W.H.; CAWSON, R.A.; HILL, G.B. Oral Cancer in England and Wales. *Studies on Medical and Population Subjects n.23*, London. H.M.S.O. 1972.

- BLOT, W.J.; WINN, D.M.; FRAUMENI Jr., J.F. Oral Cancer and Mouthwash. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983: 70: 251 - 3.

- BLOT, W.J.; McLAUGHLIN, J.K.; WINN, D.M.; AUSTIN, D.F.; GREENBERG, R. S.; PRESTON-MARTIN, S.; BERNSTEIN, L.; SCHOENBERG, J.B.; STEMHAGEN, A.; FRAUMENI Jr., J.F. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res.* 1988: 48: 3282 - 7. 1988.

- BONNE, C. Sur la présence de papillomes sur les muqueuses d'animaux badigeonnés au goudron. *Comptes Rendus. Société de Biologie* 1925: 93: 907. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. *J. Oral Pathol. Med.* 1981: 10: 129 - 46.

- BONNE,C. Uber Geschwulste bei Teertieren. Zeitschrift fur Krebsforschung 1927: 25: 1 - 22. In: EVESON,J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. J.Oral Pathol. Med. 1981:10: 129 - 46.

- BOUCK, N. & DiMAYORCA, E. Somatic mutation as the basis for malignant transformation of BHK cells by chemical carcinogenesis. Nature 1976: 264: 722 - 7.

- BOYD, N.M. & READE, P.C. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. J.Oral Pathol. Med. 1988: 17: 193 - 201.

- BOYD, N.M. & READE,P.C. Factors associated with the development of neoplasia. J.Oral Pathol. Med. 1988:17: 202 - 7.

- BOYLE,P.; ZHENG,T.; MacFARLANE,G.J.; McGINN,R.; MAISONNEUVE,P.; LA VECCHIA,C.; SCULLY,C. Recent advances in the etiology and epidemiology of head and neck cancer. Current Opinion in Oncology 1990: 2: 539 - 45.

- BROSS,I.D. & COOMBS,J. Early onset of oral cancer among women who drink and smoke. Oncology 1976: 33: 136 - 9.

- BRUGERE,J.; GUENEL,P.; LECLERC,A.; RODRIGUEZ,J. Differential Effects of Tobacco and Alcohol in Cancer of the Larynx, Pharynx, and Mouth. Cancer 1986: 57: 391 - 5.

- BRUMINI,R.; TORLONI,H.; HENSON,D.E.; GOTLIEB,S.L.D. e SOUZA,J.M.P.
Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976 a 1980,
Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 1982.

- CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature* 1981: 289: 353 - 7.

- CHEYNE,V.D.A description of the salivary glands of the rat and a
procedure for their extirpation.*J.Dent.Res.* 1939: 18: 457 - 68.

- COHEN,B. & SMITH,C.J. Aetiologycal Factors in Oral Cancer:
Exerimental Investigation of Early Epithelial Changes. *Helv.*
Odont. Acta 1967: 1: 112 - 24.

- COHEN,B.; POSWILLO,D.E.; WOODS,D.A. The effects of exposure to
chewing tobacco on the oral mucosa of monkey and man. *Ann.*
Royal Coll. Surg.Engl. 1971: 48: 255 - 73.

- DEAN,D.H. & HIRAMOTO, R.N. Oral mucosal permeability of
desalivated rats. *J.Oral Med.* 1986: 41: 170 - 1.

- DOLBY, A.E. *Oral Mucosa in Health and Disease.* Oxford. Blackwell
Scientific Publications. 1975.

- DREIZEN,S. & LEVY,B.M. *Handbook of Experimental Stomatology.* Boca
Raton, Florida, CRC Press. 1981. pag. 135 - 88.

- DUNHAM, L.J.; MUIR, C.S.; HAMNER, J.E. Epithelial atypia in hamster cheek pouches treated repeatedly with calcium hydroxide. *Br. J. Cancer* 1966: 20: 588 - 93.
- EDGAR, W.M. Saliva and Dental Health. *Br. Dent. J.* 1990:11: 96 - 8.
- EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A Review. *J. Oral Pathol. Med.* 1981: 10: 129 - 46.
- EVESON, J.W. & MACDONALD, D.G. Effects of the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide on hamsters lingual mucosa. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1977: 44: 600 - 5.
- FARBER, E. The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochem. Biophys. Acta* 1980: 605: 149 - 66.
- FARBER, E. & CAMERON, R. The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.* 1980: 31: 125 - 227.
- FERGUSON, J.W.; McMILLAN, M.D.; SMILLIE, A.C. Ultrastructural examination of experimentally induced premalignant lesions. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1991:20: 112 - 8.
- FISKER, A.V.; WEST, M.I.; PHILIPSEN, H.P.; ANDERSEN, A.H. Quantification of oral epithelial hyperplasia in rats after topical application of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Acta Odontol. Scand.* 1990: 48: 125 - 31.

- FISKER, A.V. 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 - 443.

- FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; CURADO, M.P.; PEREIRA, R. N.; SILVA, M.E.; FAVA, A.S.; TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int. J. Cancer* 1989: 43: 992 - 1000.

- FREEDMAN, A. & SHKLAR, G. Alcohol and hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1978: 46: 794 - 805.

- FUJINO, H.; CHINO, T.; IMAI, T. Experimental Production of Labial and Lingual Carcinoma by Local Application of 4-Nitroquinoline N-Oxide. *J. Nat. Cancer Inst.* 1965: 35: 907 - 18.

- FUJITA, K.; KAKU, T.; SASAKI, M.; ONOE, T. Experimental Production of Lingual Carcinomas in Hamsters by Local Application of 9,10-Dimethyl-1,2 Benzanthracene. *J. Dent. Res.* 1973: 52: 327 - 303.

- GRAHAN, S.; DAYAL, H.; ROHER, T.; SWANSON, M.; SULTZ, H.; SHEDD, E.; FISCHMAN, S. Dentition, diet, tobacco, and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977: 59: 1611 - 18.

- HASSAN, M.M.A.; SHKLAR, G.; SOLT, D.; SZABO, G. Acute effect of DMBA application on mitotic activity of hamster buccal pouch epithelium. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1985;59: 491 - 8.

- HIRAYAMA, T. An epidemiological study of oral and pharyngeal cancer Central and South-East Asia. *Bull. WHO* 1966;34: 41 - 69.

- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - Registro nacional de patologia tumoral: diagnóstico de câncer. Brasil 1981 - 1985. Rio de Janeiro, 1991. p. 212.

- ITO, U.S. **Efeitos da Xerostomia nas Estruturas Bucais do Rato.** Tese-Mestrado, Piracicaba, São Paulo, UNICAMP. 1990.

- JAFAREY, J. & ZAIDI, S.H.M. Carcinoma of the oral cavity and oropharynx in Karachi (Pakistan). *Trop. Doctor* 1976: 63 - 7.

- JORGE, A.O.C. **Efeitos da sialoadenectomia na presença de Candida albicans e candidose na cavidade bucal de ratos.** Tese-Doutorado, Piracicaba, São Paulo, UNICAMP. 1992.

- KABAT, G.C.; HEBERT, J.R.; WYNDER, E.L. Risk Factors for Oral Cancer in Women. *Cancer Res.* 1989: 49: 2803 - 6.

- KELLER, A. Z. Survivorship with mouth and pharynx cancers and their association with cirrhosis of the liver, marital status, and residence. *A.J.P.H.* 1969: 59: 1139 - 53.

- KRESHOVER, S. The effect of tobacco on epithelial tissues of mice. *J. Am. Dental Associat.* 1952:45: 528 - 40. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. *J. Oral Pathol. Med.* 1981:10: 129 - 46.

- KRESHOVER, S.J. & SALLEY, J.J. The effect of tobacco on epithelial tissues of mice. *J.A.D.A.* 1957:45: 528 - 40.

- KUTUZOV, H. & SICHER, H. The filiform and the conical papillae of the tongue in the white rat. *Anat. Rec.* 1951:110:275 - 88.

- KUTUZOV, H. & SICHER, H. Anatomy and function of the palate in the white rat. *Anat. Rec.* 1952: 114: 67 - 84.

- LEKHOLM, U.; WALLENIIUS, K.; HEYDEN, G. Alterations in the Lipid Content of Rat Palatal Epithelium during Carcinogenesis. *Histochem.* 1975: 44: 147 - 54.

- LEKHOLM, U. & WALLENIIUS, K. Effects of essential fatty acid deficiency and of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis on oral carcinogenesis in the rat. *Odont. Revy* 1976: 27: 165 - 80.

- LEKHOLM, U. & WALLENIIUS, K. Experimental oral cancer in rats with xerostomia. *Odont. Revy* 1976: 27: 11 - 8.

- LIN, L.M.; CHEN, Y.K.; HUANG, Y.L.; MOSTOFI, R.; TOTO, P. Cytokeratins in hamster cheek pouch epithelium during DMBA-induced carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 1989; 18: 287-90.
- LOQUET, C.; TOUSSAINT, G.; LeTALAER, J.Y. Studies on mutagenic constituents of apple brandy and various alcoholic beverages collected in Western France, a high incidence area for aesophageal cancer. *Mutation Res.* 1981; 88: 155 - 64.
- LUKER, J.; DE GAY, L.; CRANE, I.J.; STONE, A.; SCULLY, C.; PRIME, S.S. The effect of 3T3 fibroblasts on the expression of anchorage independence and cornification of oral keratinocytes. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 1989; 57: 19 - 26.
- MAEDA, H. & KAMEYAMA, Y. Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. *J.Oral Pathol. Med.* 1986; 15: 21 - 7.
- MANDEL, I.D. The diagnostic uses of saliva. *J.Oral Pathol. Med.* 1990; 19: 119 - 25.
- MAREFAT, M.P.; ALBRIGHT, J.T.; SHKLAR, G. Ultrastructural alterations in experimental lingual leukoplasia and carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1979; 47: 334 - 42.
- MARTÍNEZ, I. Factors associated with cancer of the esophagus, mouth, and pharynx in Puerto Rico. *J.Nat. Cancer Inst.* 1969; 42: 1069 - 94.

- MATTHEWS, J.B.; MASON,G.I.; SCULLY,C.M.; PRIME,S.S. "In situ" characterisation of the oral mucosal inflammatory cell response of rats induced by 4-nitroquinoline-N-oxide. *Carcinogenesis* 1986: 7: 783 - 8.

- MATTHEWS,J.B.; PITIGALA-ARACHCHI,A.; CRANE,I.J.; SCULLY,C.; PRIME, S.S. The relationship between epithelial Ia expression and inflammatory cell infiltrate during experimental oral carcinogenesis. *Virchows. Archiv. A Pathol. Anat.* 1988: 413: 521 - 8.

- McLAUGHLIN,J.K.; GRIDLEY,G.; BLOCK,G.; WINN,D.M.; PRESTON-MARTIN, S.; SHOENBERG,J.B.; GREENBERG, R.S.; STEMHAGEN,A.; AUSTIN,D.F.; ERSHOW,A.G.; BLOT,W.J.; FRAUMENI Jr.,J.F. Dietary Factors in Oral and Pharyngeal Cancer. *J.Natl. Cancer Inst.* 1988: 80: 1237 - 43.

- MERLETTI,F.; BOFETTA,P.; CICCONE,G.; MASHBERG,A.; TERRACINI,B. Role of Tobacco and Alcoholic Beverages in the Etiology of Cancer of the Oral Cavity Oropharynx in Torino Italy. *Cancer Res.* 1989: 49: 4919 - 24.

- MORRIS,A.L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J.Dent.Res.* 1961: 40: 3 - 15.

- MOSS, E. & LEE, W.R. Occurrence of oral and pharyngeal cancers in textile workers. *Br.J.Ind.Med.* 1974: 31: 224 - 32.

- MULLER, H.K.; HALLIDAY, G.M.; KNIGHT, B.A. Carcinogen-induced depletion of cutaneous Langerhans cells. *Br.J.Cancer* 1985: 52: 81 - 5.

- 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 Action 4-Nitroquinoline N-Oxide. *Gann* 1957: 48: 129 - 37.

- OCHIAI, E. & SEI, S. *J.Pharmac. Soc. Japan*, 65: 18, 1945. In: NAKAHARA, W.; FUKUOKA, F. e SUGIMURA, T. Carcinogenic Action 4-nitroquinoline N-oxide. *Gann* 1957: 48: 129 - 37.

- ODUKOYA, O. & SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1984: 58: 315 - 20.

- OHNE, M.; SATOH, T.; YAMADA, S.; TAKAI, H. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1985: 59: 600 - 7.

- OTSUBO, Y. & KAMEYAMA, Y. Ultrastructural changes of epithelium-connective tissue junction in experimental lingual tumors. *J.Oral Pathol. Med.* 1982: 11: 159 - 73.

- OYAMA, S. Experimentelle Studien über die Entstehung des Zungenkrebses. Mitteilungen aus der Medizinischen Akademie zu Kioto 1935: 15: 861 - 80. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. J.Oral Pathol. Med. 1981: 10: 129 - 46.

- PHILIPSEN, H.P. & FISKE, A.V. Focal acantholytic dyskeratosis in experimental oral carcinogenesis in rats. J.Oral Pathol. Med. 1983: 12: 30 - 6.

- PINDBORG, J.J. Oral cancer and Precancer. Bristol, John Wright & Sons Ltda. 1980.

- PINDBORG, J.J.; SRIVASTAVA, A.N.; GUPTA, D. Studies in oral leukoplakias. VIII. Epithelial changes in tobacco-induced leukoplakias in India. Acta Odontol.Scand. 1964: 22: 499 - 512.

- PITIGALA-ARACHCHI, A.; MATTHEWS, J.B.; CRANE, I.J.; SCULLY, C.; PRIME, S.S. Ia⁺ epithelial dendritic cells during oral carcinogenesis in the rat. J. Oral Pathol Med. 1988: 17: 138 - 44.

- PITIGALA-ARACHCHI, A.; MATTHEWS, J.B.; SCULLY, C.; PRIME, S.S. Epithelial dendritic cells and connective tissue macrophages in oral carcinogenesis and the effects of systemic Corynebacterium parvum. Carcinogenesis 1989: 10: 501 - 7.

- PRIME, S.S.; MacDONALD, D.G.; RENNIE, J.S. The effect of iron deficiency on experimental oral carcinogenesis in the rat. *Br. J. Cancer* 1983: 47: 413 - 8.

- PRIME, S.S.; MALAMDS, D.; ROSSER, T.; SCULLY, C. Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. *J. Oral Pathol Med.*: 15: 280 - 3.

- ROFFO, A.H. Leucoplasie experimentale produite par le tabac. *Sud-Américaine de Médecine et de Chirurgie* 1930: 1: 321 - 30. In: EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. *J. Oral Pathol Med.* 1981: 10: 129 - 46.

- ROSSING, M.A.; THOMAS, L.V.; McNIGHT, B. Diet and Pharyngeal Cancer. *Inst. J. Cancer* 1989: 44: 593 - 7.

- ROTHMAN, K. & KELLER, A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J. Chron. Dis* 1972: 25: 711 - 6.

- ROUSE, P. & KIDD, J.G. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of the tar tumours of rabbits. *J. Exp. Med.* 1941: 73: 365. In: BOYD, N.M. & READE, P.C. Factors associated with the development of neoplasia. *J. Oral Pathol. Med.*, 1988: 17: 202 - 7.

- SAKAI, S.; MINODA, K.; AKAGI, S.; UENO, A.; SAITO, G.; SATO, A. Studies of Chemotherapy of Trichophyton, (XI) Therapeutic Efficiency of Quinoline Derivates. *J.Sci. Res. Inst.* 1957: 51: 18 - 21.

- SALLEY, J.J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J.Dent. Res.* 1954: 33: 253 - 62.

- SANKARANARAYANAN, R.; DUFFY, S.W.; DAY, N.E.; NAIR, M.K.; PADMANKUMARY, G. A case-control investigation of cancer of the oral tongue and the floor of the mouth in Southern India. *Int. J.Cancer* 1989: 44: 617 - 21.

- SHIGAKI, S.; OTAKE, K.; NAKAJIMA, T. Regional lymph node metastasis in carcinoma of the hamster tongue. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1987: 64: 190 - 6.

- SHKLAR, G. Metabolic characteristics of experimental hamster pouch carcinomas. *Oral Surg.Oral Med. Oral Pathol.*, 20 : 336 - 339, 1965.

- SINGER, B. & GRUNDBERGER, D. *Molecular biology of mutagens and carcinogens.* New York. Plenum Press. 1983. pp. 171.

- SLOMIANY, B.L. et alii. Lipid composition and viscosity of parotid saliva in Sjogren's syndrome in man. *Arch. Oral Biol.* 1986: 31: 699 -702.

- SPITZER, W.O.; HILL, G.B.; CHAMBERS, L.W.; HELIWELL, B.E.; MUPHY, H.B. The occupation of fishing as a risk factor in cancer of the lip. *N. Engl.J.Med.* 1975: 293: 419 - 24.

- STEIDLER, N.E. & READE, P.C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1984: 57: 524 - 31.

- STEIDLER, N.E. & READE, P.C. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. *J.Oral Pathol Med.* 1986: 15: 43 - 7.

- STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. *Basic & Clinical Immunology.* 6 ed. 1987. cap. 14. pp. 186 - 87.

- STICH, H.F.; MATTHEW, B.; SANKARANARAYANAN, R.; NAIR, M.K. Remission of precancerous lesions in the oral cavity of tobacco chewers and maintenance of the protective effect of B-carotene or vitamin A. *Am.J. Clin. Nutr.* 1991: 53: 298 - 7.

- STORMBY, N.G. & WALLENIUS, K. Effect of reduced salivation on oral tumour induction in hamsters by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Odont. Revy* 1964: 15: 186 - 209.

- SUGIMURA, T.; OKABE, K.; ENDO, H. The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide. 1. Conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide by rat liver enzymes. *Gann* 1965: 56: 489 - 501.

- SUKUMAR, S.; NOTARIO, V.; MARTIN-ZANCA, D.; BARBACID, M. Induction of mamary carcinomas in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 1983: 306: 658 - 61.
- 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.
- VOGLER, W.R.; LLOYD, W.; MILMORE, B.K. A retrospective study of etiological factors in cancer of the mouth, pharynx, and larynx. *Cancer* 1962: 15: 246 - 58.
- WALLENIOUS, K. Experimental oral cancer in the rat with special reference to the influence of saliva. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1966: suppl. 180.
- WALLENIOUS, K. & LEKHOLM, U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odont. Revy* 1973: 24: 39 - 48.
- WALLENIOUS, K. & LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water- or fat-soluble carcinogens. *Odont. Revy* 1973: 24: 115 - 26.
- WALLENIOUS, K.; AHLSTROM, U.; HEYDEN, G. Cytogenetic and histochemical analysis of experimental oral carcinogenesis in the rat. *Odont. Revy* 1975: 26: 309 - 26.

- WEAVER, A.; FLEMING, S.M.; SMITH, D.B. Mouthwash and Oral Cancer: carcinogen or coincidence? *J.Oral Surg.* 1979:37: 250 - 3.
- WEITZMAN, S.A.; WEITBERG, A.B.; STOSSEL, T.P.; SCHWARTZ, J.; SHKLAR, G. Effects of Hydrogen Peroxide on Oral Carcinogenesis in Hamsters. *J.Periodontol.* 1986: 57: 685 - 8.
- WHITE, F.H.; GOHARI, K.; SMITH, C.J. Histological and ultrastructural morphology of 7,12 dimethylbenzanthracene carcinogenesis in hamster cheek pouch epithelium. *Diagnostic. Histopathol.* 1981: 4: 307 - 33.
- WINN, D.M.; ZIEGLER, R.G.; PICKLE, L.W.; BLOT, W.J.; HOOVER, R.N. Diet in the Etiology of Oral and Pharyngeal Cancer among Woman from the Southern United States. *Cancer Res.* 1984: 44: 1216 - 22.
- WONG, P.N.C. & WILSON, D.F. 4 Nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in rat palate. *J.Oral Pathol Med.* 1983: 12: 375 - 84.
- WYNDER, E.L.; IRWIN, J.B.; FELDMAN, M. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* 1957: 10: 1300 - 23.
- WYNDER, E.L.; KABAT, G.; ROSENBERG, S.; LEVENSTEIN, M. Oral cancer and Mouthwash Use. *J.Natl.Cancer Inst.* 1983: 70: 255 - 60.

- YING, T.S. ENOMOTO,K.; SARMA, D.S.R.; FARBER,E. 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: 42: 876 - 880, 1982.
-

* As referências bibliográficas contidas neste trabalho obedecem as normas estabelecidas pela revista JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE.