



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



FABIO ORNELLAS PRADO

Cirurgião-Dentista

**INFLUÊNCIA DA IMUNOSSUPRESSÃO PELA
CICLOSPORINA A SOBRE A CARCINOGENESE PELO
ÓXIDO DE NITROQUINOLINA EM GENGIVA DE RATAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, para
a obtenção do título de Mestre em
Estomatopatologia, área de
Estomatologia.

PIRACICABA

- 2003 -

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FABIO ORNELLAS PRADO

**INFLUÊNCIA DA IMUNOSSUPRESSÃO PELA
CICLOSPORINA A SOBRE A CARCINOGENESE PELO
ÓXIDO DE NITROQUINOLINA EM GENGIVA DE RATAS**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/03

CPG. 30 / 04 / 2003

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia, área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria Rita Brancini de Oliveira
Prof. Dr. Heron Fernando de Sousa Gonzaga
Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório

PIRACICABA

-2003 –

UNIDADE	BP
Nº CHAMADA	TI/UNICAMP
	P882i
V	EX
TOMBO BCI	55174
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/08/03
Nº CPD	

CM00187144-5

3113 10 296350

Ficha Catalográfica

~~P883i~~
P882i

Prado, Fabio Ornellas.

Influência da imunossupressão pela ciclosporina A sobre a carcinogênese pelo óxido de nitroquinolina em gengiva de ratas. / Fabio Ornellas Prado. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003. xi, 74f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Câncer. 2. Imunologia. I. Spolidório, Luís Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2003, considerou o candidato FÁBIO ORNELLAS PRADO aprovado.

1. Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDÓRIO _____

2. Profa. Dra. MARIA RITA BRANCINI DE OLIVEIRA _____

3. Prof. Dr. HERON FERNANDO DE SOUZA GONZAGA _____

200326897

Dedico este trabalho

A **DEUS**, por conceder vida, prover força e Amor, mesmo nos momentos em que dEle me esqueci.

Aos meus pais, Glair Ornellas Maricato e Airton José Gonçalves Prado, instrumentos do Pai que me transmitem o Amor dEle.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela confiança, incentivo e tranquilidade a mim transmitida durante nossa convivência.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, do Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Coordenador Geral dos Programas de Pós-Graduação desta Faculdade, e do Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, pela utilização da área da FOAr durante o desenvolvimento da parte experimental do presente trabalho.

Aos professores das disciplinas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, Prof. Dr. Edgar Graner, Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas, pela amizade, pelos ensinamentos e orientação segura e competente.

Aos professores da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Profa. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira, Prof. Dr. Carlos Benatti Neto, Prof. Dr. Carlos Alberto de Sousa Costa e Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório, pela amizade e excelentes momentos de convivência desde a graduação.

Ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por permitir o uso do Fotomicroscópio da Disciplina de Fisiologia.

À amiga e colega de Pós-Graduação Karina Antunes Neves, pelo auxílio em diversas partes deste trabalho, pelas caronas, pelo ombro amigo em momentos não tão felizes, e pelas boas risadas que habitualmente damos juntos.

Ao amigo José Antônio Sampaio Zuanon, pelo trabalho esmerado em todas as etapas técnicas deste trabalho, pelos "saltos quânticos", pelas boas músicas e força de caráter e incentivo passados durante este ano de convivência.

Ao amigo e colega de turma Fabio Augusto Ito, pelo auxílio com as imagens.

Ao amigo-irmão Edwin Fernando Ruiz Contreras, pela amizade sincera, incentivo, auxílio nos momentos de necessidade, pelos ótimos momentos de convivência tanto durante a Graduação (quando éramos parceiros de Clínica) quanto na Pós-Graduação. Meu irmão, não consigo expressar minha gratidão por palavras, mas aqui fica a tentativa...

Aos meus (também) pais, Nelson Jorge Maricato e Maria Cristina da Cruz Prado, e aos meus irmão Lawrence da Cruz Prado e Felipe da Cruz Prado, pela base sólida que só uma (grande) família pode dar. Desculpas pelas ausências...

À Tanise Kormann, pelo conforto do bem-querer.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação Francisco, Lucinei, Fábio Ito, Luciana, Ademar, Andresa, Eduardo, Sílvia, Cláudio, Danyel, Fábio Ramoa, Fábio Alves, Estela, Marcelo, Karina, Paola, Roberto, Ana Lúcia, Hercílio Júnior, Juliana, Dawton, Sabina, Michele Agostini, Michele Pereira, Jorge, Paulo Faria.

À amiga Patrícia Jardim, pelo apoio em momentos difíceis, pelas orações, pela fé contagiante em nosso Criador. Você é uma bênção entre nós!

À Neida, André e Anderson Kohout, por fazerem de sua casa minha casa por um ano, e pela sólida amizade, quase um parentesco...

Aos amigos da Turma LXX da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial Daniel, Joane, Geraldo, Ricardo Lutti, Ricardo Gomes, Ricardo Loboda, Juliano, Gustavo, Leoni, Daniela, Flávia Reis, Flávia Bechara Carrara, Andréa, Cleiner, Ana Gláucia, Ariana.

Aos amigos Erasmo Arrivabene e Caio Bourg, pela amizade desde os tempos de Prisma em São Sebastião.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1 Periodonto.....	08
2.1.1 Gengiva Humana.....	08
2.1.2 Gengiva de Ratos.....	11
2.1.3 Alterações Gengivais.....	11
2.2 Ciclosporina A	12
2.2.1 Histórico.....	12
2.2.2 Indicações terapêuticas.....	12
2.2.3 Mecanismo de ação.....	14
2.2.4 Absorção e Metabolismo.....	15
2.2.5 Vias de administração e posologia.....	15
2.2.6 Efeitos colaterais.....	16
2.3 Carcinogênese Bucal Experimental.....	21
2.3.1 Histórico da Carcinogênese Bucal Experimental.....	21

2.3.2 Dimetilbenzantraceno.....	21
2.3.3 Óxido de Nitroquinolina.....	22
2.3.3.1 Métodos de aplicação.....	23
2.3.3.2 Lesões causadas pelo 4NQO em boca.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	26
3.2 Ciclosporina A.....	26
3.3 Óxido de Nitroquinolina.....	27
3.4 Observações macroscópicas.....	28
3.5 Observações microscópicas.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Ratas.....	31
4.2 Aspectos Macroscópicos.....	33
4.2.1 Aumento do Volume Gengival.....	34
4.2.2 Aumento na rugosidade tecidual.....	34
4.2.3 Presença de Lesão Branca.....	35
4.2.4 Outras ocorrências.....	35
4.3 Aspectos Microscópicos.....	38

4.3.1 Acantose.....	39
4.3.2 Hiperqueratose.....	39
4.3.3 Displasia Leve.....	40
4.3.4 Displasia Moderada.....	40
4.3.5 Displasia Severa.....	41
4.3.6 Carcinoma.....	41
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1 Animais	46
5.2 Ciclosporina A.....	47
5.3 Óxido de Nitroquinolina.....	49
5.4 Ciclosporina A + Óxido de Nitroquinolina.....	52
5.5 Comparação entre os grupos.....	53
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	74

RESUMO

A Ciclosporina A é uma droga imunossupressora seletiva para linfócitos T, sendo atualmente muito utilizada na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos e de medula óssea. Apesar de aumentar significativamente a sobrevivência dos pacientes que dela fazem uso, a Ciclosporina A apresenta diversos efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, aumento gengival e há relatos de aumento na incidência de neoplasias malignas. O propósito do presente estudo foi avaliar a carcinogênese em gengiva de ratas tratadas diariamente com uma dose de Ciclosporina A de 10 mg/kg de peso corporal por dia, portanto, imunossuprimidas, associada à aplicação tópica do carcinógeno óxido de nitroquinolina diluído até a concentração final de 0,5% em propilenoglicol no palato, por três vezes semanais, durante o período de 240 dias. As ratas foram divididas em quatro grupos: Controle, sem tratamento com as drogas; Ciclosporina A, onde foram tratadas somente com tal droga, Óxido de Nitroquinolina, também com tratamento somente com a droga, e Ciclosporina A + Óxido de Nitroquinolina, onde as drogas administradas associadamente.

As mandíbulas das ratas foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente. Macroscopicamente nos grupos Controle e tratados com Ciclosporina A somente, nenhuma alteração foi detectada. Nos grupos tratados com Ciclosporina A e Óxido de Nitroquinolina associados e com Óxido de Nitroquinolina somente, observaram-se alterações como aumento na rugosidade tecidual, áreas com coloração esbranquiçada, ulcerações. Microscopicamente

foram observadas nos mesmos grupos acantose e hiperqueratose, diversos graus de displasia epitelial e carcinoma. Porém, a imunossupressão não provocou aumento no número nem na severidade das lesões do grupo tratado com a associação das drogas quando comparado ao grupo tratado somente com Óxido de Nitroquinolina, levando à conclusão que a imunossupressão não aumenta a carcinogenicidade na gengiva das ratas.

ABSTRACT

Cyclosporin A is an immunosuppressant drug selective for T lymphocytes, used to prevent rejection of transplanted solid organs and bone marrow. Despite the significant increase in lifespan of their users, Cyclosporin A has several side effects, like nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, gingival overgrowth and there are reports of increase in malign neoplasms incidence. The purpose of this study was to evaluate the gingival carcinogenesis in female rats treated daily with a 10 mg/kg dose of Cyclosporin A, associated to topical application of the carcinogen nitroquinoline oxide diluted to the final concentration of 0,5% in propylenoglicol in palate, three times a week, during 240 days. Rats were divided in four groups: control, without any form of treatment; Cyclosporin A, treated with this drug only, Nitroquinoline Oxide, treated only with this drug; and Cyclosporin A + Nitroquinoline Oxide, where both drugs were administered associated.

The mandibles of the rats were analysed macroscopically and microscopically. Macroscopically in groups control and Cyclosporin A, no alterations were observed. In groups treated with association of Cyclosporin A and Nitroquinoline Oxide, and with Nitroquinoline Oxide alone, were observed alterations like increase in tissue roughness, areas with white lesions, ulcers. Microscopically were observed in the same groups acantosis and hyperkeratosis, several scores of epithelial dysplasia and carcinoma. However, the immunosuppression did not increase the number or severity of the lesions in the group treated with association of drugs when compared to the group treated with

Nitroquinoline Oxide alone. We concluded in the present work that immunosuppression did not increase carcinogenesis in female rats gingiva.

1. INTRODUÇÃO

A Ciclosporina A (CsA) é uma droga com potente ação imunossupressora (BOREL & LAFFERTY, 1983; SEYMOUR & JACOBS, 1992). Seu principal emprego nos dias atuais é na profilaxia e tratamento da rejeição de órgãos alogênicos transplantados (VOLPE et al., 1997; MYRILLAS et al., 1999; NIEH et al., 1999).

Porém, a CsA pode apresentar efeitos colaterais, sendo os mais comuns a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade (CARP et al., 1997; SEYMOUR et al., 1997). No meio oral, o efeito colateral mais comum causado pela CsA é o aumento gengival (FU et al., 1995).

Em pacientes que fazem uso da CsA por longos períodos, relatos indicam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias malignas, principalmente linfomas, sarcoma de Kaposi, cânceres de pele e lábio, carcinoma escamoso de colo de útero, vulva e períneo (JACOBS et al., 1981; BIRKELAND, 1983; PENN, 1987).

Na região de cabeça e pescoço, há relatos de sarcomas de Kaposi após infecção por CMV em gengiva de paciente que sofreu transplante de rim e foi tratado com CsA (SIEGAL et al., 1990). Também foram relatados em pacientes imunossuprimidos pela CsA carcinoma de células escamosas principalmente no lábio inferior (REGEV et al., 1992; THOMAS et al., 1993), carcinoma de laringe (NAMYSLOWSKI et al., 1994), adenocarcinoma localizado na mucosa bucal em paciente portador de psoríase (YAMAMOTO et al., 1996).

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da imunossupressão pela Ciclosporina A sobre a carcinogênese pelo óxido de nitroquinolina em gengivas de ratas.

Revisão da Literatura

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – PERIODONTO

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) compreende os seguintes tecidos: 1) gengiva; 2) ligamento periodontal; 3) cemento radicular e 4) osso alveolar. A principal função do periodonto é inserir o elemento dental no tecido ósseo mandibular ou maxilar e manter a integridade da superfície mastigatória (LINDHE, 1999).

Uma breve descrição da gengiva normal, que é o tecido periodontal focado neste estudo, será feita a seguir.

2.1.1 GENGIVA HUMANA

A gengiva estruturalmente compreende elementos teciduais epiteliais e conjuntivos, bem como vasos e nervos. Recobre a porção coronal do processo alveolar, passando sobre a crista do osso alveolar e septo interdental e circunda a porção cervical dos dentes. É dividida em gengiva inserida e gengiva marginal “livre”. Esta última é composta de uma estreita faixa de tecido que segue o contorno dos dentes e da junção amelo-cementária. Em condições normais, esta porção de tecido não é propriamente ‘livre’, mas delicadamente inserida à superfície dental (esmalte ou cemento) e contém feixes de fibras conjuntivas que se inserem no cemento supra-alveolar e crista do osso alveolar. Apresenta-se

mais pronunciada na face vestibular do que na face lingual quando analisada microscopicamente em corte vestibulo-lingual.

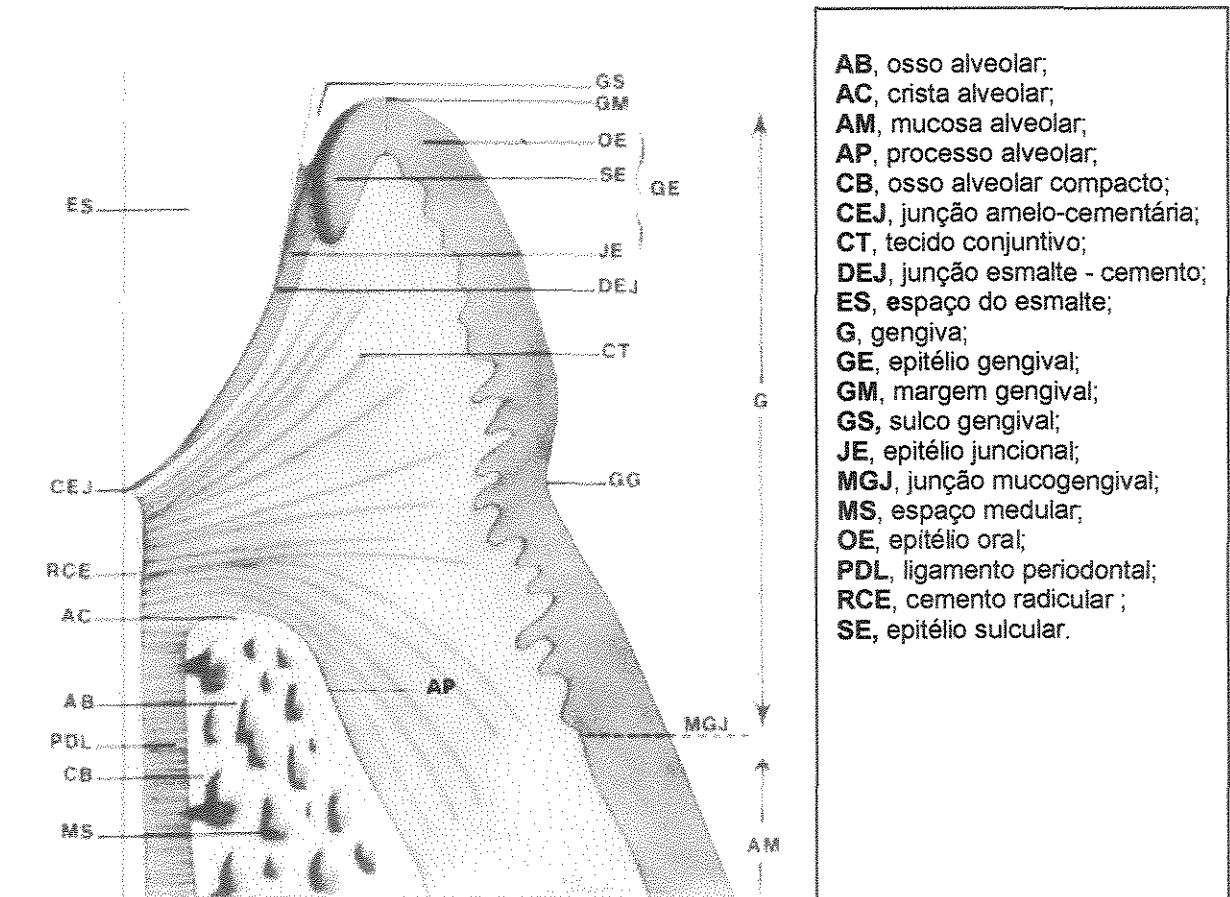


Figura 1: Ilustração das estruturas periodontais de um dente mandibular, próximo à região cervical do mesmo (LISTGARTEN, 1999).¹

¹ Figura extraída do site <http://www.temple.edu/dentistry/perio/periodontology/gu0102.htm>, de autoria de Max Listgarten. Site criado em 8 de maio de 1999, última revisão em 15 de janeiro de 2002, acessado no dia 04 de dezembro de 2002. Todos os direitos reservados ao autor.

O epitélio juncional (sigla na figura: JE) é um colar com aproximadamente dois milímetros de largura ocluso-apical e se estende da junção amelo-cementária até a porção mais inferior do sulco gengival. O epitélio juncional forma e suporta a inserção epitelial e é contínuo ao epitélio sulcular na porção mais profunda do sulco. É do tipo escamoso estratificado não queratinizado, composto por duas camadas, a camada basal e suprabasal. Corresponde, em volume, a 4% da gengiva marginal “livre”.

O epitélio sulcular (SE) forma a parede lateral do sulco gengival e é contínuo com a porção mais oclusal do epitélio juncional. Estruturalmente, assemelha-se ao epitélio gengival. O epitélio sulcular tem aparência multicamada (estratificado) e é freqüentemente paraqueratinizado. Não há estrato córneo homogêneo. O epitélio sulcular é bem menos permeável do que o epitélio juncional e normalmente não é infiltrado por leucócitos.

O epitélio gengival recobre as superfícies vestibular e lingual/palatina da gengiva alveolar e marginal, e a papila interdental. Tem espessura de 0,2 a 0,3 milímetros e é composta de quatro camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. Juntamente com o epitélio sulcular corresponde a 27% do volume da gengiva marginal “livre”.

O tecido conjuntivo (CT) é responsável por 69% (em volume) da gengiva marginal “livre”. Aproximadamente 50 a 60% consistem de fibrilas colágenas, entre feixes de fibras. Este tecido fibroso e denso contém numerosas células, a maioria das quais fibroblastos. Também são observados na gengiva normal linfócitos, monócitos e macrófagos isolados, não em forma de infiltrado.

O tecido conjuntivo é reposto em alta taxa na gengiva, mais rapidamente do que no osso alveolar ou pele (SCHROEDER, 1991).

2.1.2 GENGIVA DE RATOS

O epitélio gengival de ratos é estratificado, escamoso queratinizado. Esta porção do epitélio corresponde ao epitélio gengival humano descrito anteriormente.

Na gengiva marginal pode-se observar o epitélio sulcular, menos queratinizado quando comparado ao epitélio gengival, e o epitélio juncional, não queratinizado, também similar ao epitélio juncional da gengiva humana.

A relação geral do epitélio oral, epitélio sulcular e epitélio juncional em ratos é similar àquela observada em humanos. Certas diferenças ocorrem no grau de queratinização do epitélio gengival e epitélio sulcular. O epitélio gengival em ratos parece ser mais queratinizado quando comparado ao epitélio gengival de humanos (LISTGARTEN, 1975). As similaridades anatômicas do periodonto de ratos quando comparados ao periodonto humano, somadas à fácil disponibilidade e manuseio fazem deste animal um dos mais adequados para estudos experimentais (NISHIKAWA, 1996).

2.1.3 ALTERAÇÕES GENGIVAIS

As alterações provocadas pela Ciclosporina A e pelo Óxido de Nitroquinolina nos tecidos gengivais de ratos serão abordadas nos respectivos capítulos.

2.2- CICLOSPORINA A

2.2.1 HISTÓRICO

A Ciclosporina A (CsA), um undecapeptídeo cíclico lipofílico (fórmula: $C_{62}H_{111}O_{12}$, Peso Molecular = 1206,6 kDa) é resultante da fermentação dos produtos metabólicos de duas espécies fúngicas encontradas no solo, *Trichoderma polysporum* rifai e *Cylindrocarpum lucidum* (DALEY & WYSOCKI, 1984). Foi descrita por BOREL na década de setenta (BOREL, 1976) e inicialmente empregada como agente antifúngico, porém suas atividades antibióticas foram consideradas restritas (MORRIS, 1981). Em seu estudo, BOREL descreveu o efeito imunossupressor seletivo da droga, levando a pesquisas sobre o seu uso no tratamento de desordens mediadas imunologicamente. Calne e colaboradores (1979) conduziram os primeiros estudos sobre os efeitos da CsA em humanos submetidos a transplante de rim.

Após aprovação pelo Food and Drug Administration em 1985 (STEINMULLER, 1985), tem sido empregada como principal imunossupressor em indivíduos órgão-transplantados.

2.2.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Após seu uso inicial como agente anti-fúngico (atualmente descontinuado), diversas pesquisas foram conduzidas no campo de emprego da CsA. Foram descritas atividades anti-parasitária, anti-viral, anti-inflamatória,

porém, devido à potente ação imunossupressora (BOREL & LAFFERTY, 1983; SEYMOUR & JACOBS, 1992), seu principal emprego nos dias atuais é na profilaxia e tratamento da rejeição de órgãos alogênicos transplantados (VOLPE et al., 1997; MYRILLAS et al., 1999; NIEH et al., 1999), tanto transplante de órgãos sólidos como coração (HARDESTY et al., 1983; KOBASHIGAWA, 1998), rim (HOLT, 2002), fígado (MOSER, 2002), pulmão (KAMHOLZ et al., 1983), quanto na prevenção e tratamento da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD – sigla em Inglês: Graft versus Host Disease), que é a principal causa de morbidade entre os pacientes que sofreram Transplante de Medula Óssea (SULLIVAN, 1999, JACOBSON & VOGELSANG, 2002).

Também há relatos de tratamento pela CsA das seguintes condições: pênfigo e penfigóide (THIVOLET et al., 1985; BARTHELEMY et al., 1993), penfigóide cicatricial ocular (PALESTINE et al., 1984), dermatite atópica (VAN JOOST et al., 1987), dermatomiosite (EJSTRUT, 1986), lúpus eritematoso sistêmico (FEUTREN et al., 1986; JAMES et al., 1998), esclerose múltipla (MERTIN et al., 1980; JAMES et al., 1998), diabetes melitus tipo I (STILLER et al., 1983), doença de Behçet (NUSSENBLATT et al., 1985), alopecia areata (PARODI et al., 1987), pioderma gangrenoso (ELGART et al., 1991; CARP et al., 1997; HUGHES et al., 2000), micose fungóide (JENSEN et al., 1987; KEMME et al., 1992), síndrome de Sèzary (KEMME et al., 1992), esquistossomose (BUEDING et al., 1981), malária (THOMMEN, 1981), colite ulcerativa (GUPTA et al., 1984), sarcoidose pulmonar (REBUCK et al., 1984), asma (SUGANO et al., 1998), artrite reumatóide (MULLER et al., 1979), líquen plano oral (EISEN et al., 1990;

HARPENAU et al., 1995; JAMES et al., 1998), citopenia associada à leucemia linfocítica crônica (CORTES et al., 2001), mieloma múltiplo (WIERNIK et al., 1994), miastenia severa (GOULON et al., 1989), piodermatite-pioestomatite vegetante (BRINKMEIER et al., 2001).

2.2.3 MECANISMO DE AÇÃO DA CSA

A CsA exerce atividade imunossupressora inibindo linfócitos T (CD4+) de maneira aparentemente seletiva (YAMADA et al., 1992) com pouca ou nenhuma ação na resposta humoral mediada por linfócitos B (SEYMOUR & JACOBS, 1992).

O mecanismo molecular de ação da CsA se baseia na ligação da droga à ciclofilina - uma proteína intracelular de ligação da família das imunofilinas. A formação do complexo CsA:Ciclofilina se liga à calcineurina, bloqueando sua propriedade de ativar a família de Fatores nucleares de Células T Ativadas (NFATc). As NFATc após ativação no citoplasma, migram para o núcleo onde regulam a transcrição de genes de citocinas que normalmente estimulam a resposta imune. Porém, como tal fator de transcrição não foi ativado em decorrência da inibição por competição da CsA, a produção de citocinas fica inibida (CLIPSTONE et al., 1992; JANEWAY et al., 2001).

2.2.4 ABSORÇÃO E METABOLISMO

A absorção da CsA quando administrada por via oral em humanos ocorre parcialmente no trato gastrointestinal (GURECKI e col, 1985). A droga é encontrada no sangue ligada a células e lipoproteínas, sendo 50% nos eritrócitos, 40% no plasma e 10% nos leucócitos (BUONPANE, 1990). Uma vez que a CsA permanece armazenada em adipócitos e em órgãos como o fígado, pulmão, baço e linfonodos (ATKINSON et al., 1982), uma lenta redistribuição sangüínea ocorre após a cessação da administração da droga, mantendo uma baixa concentração sérica da droga por algum tempo.

A metabolização da CsA ocorre no fígado através de isoenzimas do citocromo P-450 (KAHAN, 1989), sendo o metabolismo semelhante em humanos, cães, coelhos e ratos (MAURER et al., 1984). A CsA pode ser degradada em 14 metabólitos diferentes, com atividade imunossupressora substancialmente menor do que a forma nativa da droga, porém tais metabólitos apresentam efeitos tóxicos (KAHAN, 1989). O fígado é responsável pela excreção de 90% da CsA através da bile para as fezes, os 10% restantes são excretados pela urina (SEYMOUR & JACOBS, 1992).

2.2.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E POSOLOGIA

A CsA pode ser administrada por via oral, intramuscular, intravenosa, intraperitonal ou subcutânea. O pico de concentração plasmática da droga ocorre, em humanos, entre 2 a 6 horas após a administração por via oral (KEOWN et al., 1982). Estudos *in vitro* e *in vivo* de KEOWN e colaboradores (1981) relataram que

uma dose inicial de CsA que proporcionasse níveis séricos entre 100 e 400 ng/ml seria efetiva na obtenção de imunossupressão sem causar efeitos colaterais intensos.

A via de administração subcutânea é a que apresenta maiores vantagens em ratos, por não requerer anestesia, ser bem tolerada pelo animal e permitir níveis plasmáticos adequados e uniformes da droga, que são obtidos com a administração de cerca de 10 mg/kg/dia de CsA (WASSEF et al, 1985).

2.2.6 EFEITOS COLATERAIS

A CsA pode apresentar efeitos colaterais, sendo os órgãos mais acometidos o rim e o fígado (CARP et al., 1997; SEYMOUR et al., 1997).

A ação da CsA sobre o rim a longo prazo pode provocar hipertensão renal, lipidemia e fibrose intersticial (MATHIESON, 2000). Tais efeitos colaterais são reversíveis com uma diminuição na dose da droga.

A CsA pode gerar espécies reativas de oxigênio e causar a peroxidação de lipídeos, que estão diretamente envolvidas na hepatotoxicidade pela droga (ANDRES et al., 2002).

Além dos rins e fígado, a CsA pode ser também neurotóxica. Os efeitos da CsA sobre o sistema neurológico podem ocasionar tremor, agitação, insônia, ansiedade, cefaléia, amnésia, confusão, parestesia, desmaios, fraqueza motora e ataxia (GIJTENBEEK et al., 1999).

Outros relatos de efeitos colaterais da CsA foram: hipertensão arterial, fadiga, anemia, hiperuricemia, hirsutismo, hipercalcemia, mialgia (PALESTINE et al., 1984; VON GRAFFENRIED et al., 1986).

Além dos relatos acima, pacientes que fazem uso da CsA apresentam maior risco de desenvolver infecções oportunistas causadas por *Citomegalovírus* (CMV), *Pneumocystis carinii*, *Candida sp.* (MIN et al., 1991).

No meio oral, há presença de infecções fúngicas e virais, sendo a candidose a infecção fúngica que mais acomete pacientes imunossuprimidos pela CsA. KING et al. (1994) relataram que 10,1% dos pacientes tratados com CsA apresentaram infecção por *Candida*. Já as infecções virais mais freqüentes observadas em pacientes em tratamento com CsA são as causadas pelo CMV, e pelo Vírus da Herpes Simples (HSV) (JOHN et al., 1994; ODOM, 1994; SEYMOUR et al., 1997).

Há relato de leucoplasia pilosa em 11,3% dos pacientes que sofreram transplantes de rim e terapia com CsA (KING et al., 1994).

Porém, no meio oral, o efeito colateral mais comum causado pela CsA é o aumento gengival. Acomete entre 25 a 80 % dos pacientes em tratamento (ROSS ET AL., 1989; McGAW et al., 1988; DELILIERS et al., 1986; FU et al., 1995). A dosagem sérica necessária para provocar aumento gengival parece estar em torno de 170 a 200 ng/ml (ROSS et al., 1989), embora alguns autores não tenham encontrado correlação entre dosagem de CsA e aumento gengival (SEYMOUR & SMITH, 1991; WY SOCKI et al., 1983), além do fato de haver ampla

variação na susceptibilidade individual e nos aspectos clínicos do crescimento gengival.

Em humanos, os aumentos gengivais acometem mais crianças que adultos. (ALLMAN et al., 1994, KARPINIA et al., 1996, KILPATRICK et al., 1997, LOWRY et al., 1995). Em ratos, tal observação se repete, os aumentos gengivais são mais pronunciados em animais jovens do que em animais adultos (NISHIKAWA et al., 1996).

O mecanismo de ação da CsA que causa o aumento gengival ainda permanece obscuro. Diversos autores sugerem que o aumento gengival seja induzido por um aumento na quantidade de fibras colágenas no tecido conjuntivo gengival (RATEITSCHAK-PLÜSS et al., 1983; WYSOCKI et al., 1983; DELILIERIS et al., 1986; BONNAURE-MALLET et al., 1995). Outros sugerem que o aumento gengival ocorra devido à proliferação epitelial, e não em decorrência do aumento na produção de colágeno (PISANTY et al., 1990).

Recentemente, tem sido dada atenção ao papel dos fatores de crescimento na indução do crescimento gengival induzido por drogas. Dentre tais fatores, o Fator de Crescimento Epitelial (EGF) e o Fator de Crescimento Transformante (TGF) parecem estar envolvidos no mecanismo de aumento de volume gengival induzido por drogas (GAME et al., 1990; BOLTCHI et al., 1999; BUDUNELI et al., 2001). Em análise de biópsias de pacientes transplantados, imunossuprimidos pela CsA e com aumento gengival, BUDUNELI et al. (2001) detectaram, através de imunohistoquímica, um aumento nos receptores para EGF no epitélio gengival destes pacientes, aventando através destes resultados a

hipótese de que a expressão elevada de receptores para EGF poderia ser relevante para a patogênese do crescimento gengival induzido pela CsA. Da mesma forma, SHIN et al. (1998) relataram estimulação da expressão de TGF *in vivo* em humanos induzida pela CsA. COTRIM et al. (2002), descreveram também que a CsA estimulou a expressão e produção de TGF- β 1, sugerindo que tal fator de crescimento pudesse contribuir de maneira autócrina para uma redução na atividade proteolítica dos fibroblastos gengivais humanos.

Em pacientes que fazem uso da CsA por longos períodos, parece haver maior susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias malignas. OLIVARI et al. (1990) relataram incidência de malignidades em 8% dos pacientes que sofreram transplante cardíaco e foram tratados com CsA. Já MILAHOV et al. (1996) relataram incidência de malignidades em 15,6% dos pacientes que receberam transplantes de órgãos sólidos e em estado de imunossupressão pela CsA.

As neoplasias malignas mais observadas em pacientes transplantados e imunossuprimidos pela CsA são as seguintes: linfomas, sarcoma de Kaposi, cânceres de pele e lábio, carcinoma escamoso de colo de útero, vulva e períneo (JACOBS et al., 1981; BIRKELAND, 1983; PENN, 1987).

Na região de cabeça e pescoço, há relatos de sarcomas de Kaposi após infecção por CMV em gengiva de paciente que sofreu transplante de rim e foi tratado com CsA (SIEGAL et al., 1990). Também foram relatados em pacientes imunossuprimidos pela CsA carcinoma de células escamosas principalmente no lábio inferior (REGEV et al., 1992; THOMAS et al., 1993), carcinoma de laringe

(NAMYSLOWSKI et al., 1994), adenocarcinoma localizado na mucosa bucal em paciente portador de psoríase (YAMAMOTO et al., 1996).

De fato, as neoplasias malignas de modo geral são responsáveis por 30 a 40 % do total de pacientes transplantados que vêm a óbito (TANAKA et al., 2002). A alta taxa de incidência de neoplasias parece dever-se à debilidade do sistema imunológico do receptor, neste estado devido à terapia imunossupressora. Tal debilidade causaria a falha na detecção e resposta a proteínas associadas especificamente com as neoplasias malignas (NABEL, 1999).

HOJO et al. (1999) relataram que células de adenocarcinoma pulmonar tratadas *in vitro* pela CsA dividiram-se mais facilmente, mostraram mudanças morfológicas, mobilidade aumentada e possibilidade de crescimento sem necessitarem de ancoragem a superfície sólida. Sugeriram que a CsA promoveria crescimento tumoral por um mecanismo autônomo-celular, independente dos efeitos da droga sobre o sistema imunológico, através da indução da síntese do Fator de Crescimento Transformador (TGF- β).

O papel da CsA na indução e progressão de neoplasias malignas permanece controverso. Parece haver consenso nas possíveis propriedades de indução de malignidade a algumas linhagens celulares, porém não é certo se esta indução ocorre a células pré-cancerosas ou se há conversão de células saudáveis a um estado canceroso.

Na literatura, existem poucos relatos de casos clínicos de neoplasias malignas em boca associadas a CsA, alguns citados anteriormente. Porém,

nenhum estudo dos efeitos do uso de longo termo da droga sobre a prevalência de neoplasias malignas em meio oral foi realizado.

2.3 – CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL

2.3.1 HISTÓRICO DA CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

As primeiras observações sobre carcinogênese química foram feitas por Sir Percival Pott, que relatou câncer de escroto em limpadores de chaminé, ambiente repleto de fuligem. Tal relato estimulou a avaliação da potencialidade carcinogênica dos hidrocarbonetos sobre o câncer de pele em animais experimentais. Surgia assim a carcinogênese química experimental, cujo objetivo é investigar mecanismos carcinogênicos, prevenir danos causados por substâncias químicas comumente utilizadas e prover modelos animais para pesquisa no tratamento de câncer. Um modelo de câncer oral pode ser usado para estudar a patogênese, para avaliar critérios diagnósticos e prognósticos e pesquisar novas modalidades de tratamento (NAUTA et al., 1995).

Após os relatos pioneiros de Sir Pott, BONNE (1925) observou em camundongos tratados com alcatrão na pele a presença de papilomas na boca e estômago, devido à ingestão do carcinógeno durante o ato de lambe-se.

2.3.2 DIMETILBENZANTRACENO (DMBA)

O primeiro modelo de carcinogênese bucal em animais usado com sucesso foi descrito por SALLEY em 1954, que consistia na aplicação de um

hidrocarboneto policíclico aromático – o dimetilbenzantraceno (DMBA) a 0,5%, diluído em acetona, na bolsa da bochecha de hamster. Tal modelo provocou a formação de alterações epiteliais progressivas, como hiperplasia epitelial, papiloma, carcinoma *in situ* e carcinoma espinocelular. Apesar de tal modelo sofrer algumas críticas por a bolsa da bochecha de hamster ter estrutura diferente da mucosa bucal humana, tem sido utilizado por muitos autores (FUJITA et al., 1973; HASSAN et al., 1985).

2.3.3 ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4-NQO)

O Óxido de nitroquinolina (4-NQO) é outro potente agente carcinogênico, que juntamente com o DMBA na bolsa da bochecha de hamster é o modelo mais utilizado para o estudo da carcinogênese bucal em animais de experimentação. Foi sintetizado em 1943 por OCHIAI e colaboradores a partir de uma quinolina que reage com peróxido de hidrogênio, incorporando um radical nitro (NAKAHARA et al., 1957). O 4-NQO é convertido *in vivo* para 4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido (4HAQO) e em seguida convertida em um metabólito altamente reativo, o seril –4HAQO (SUGIMURA et al., 1966). Este metabólito formado liga-se covalentemente ao DNA nuclear induzindo mutações em bases nitrogenadas, deleções, conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (KAWAZOE et al., 1970; NAGAO & SUGIMURA, 1976).

NAKAHARA et al. (1957) induziram câncer de pele em camundongos pincelados com 4-NQO. FUJINO et al. (1965) induziram, através da aplicação de 4-NQO em lábio de hamsters, carcinomas de lábio e de língua.

Porém, o 4-NQO como modelo experimental de carcinogênese bucal tornou-se mais utilizado quando WALLENIOUS & LEKHOLM em 1973 empregaram o 4-NQO diluído a 0,5% em propilenoglicol na boca de ratos.

2.3.3.1 MÉTODOS DE APLICAÇÃO

FUJINO et al.(1965) aplicaram o 4NQO no lábio de camundongos diluído a 0,25% em benzeno. Obtiveram resultados em 50% dos ratos tratados, após seis meses ou mais. A diluição em benzeno foi substituída algum tempo depois pelo preparo do 4NQO diluído a 0,5% em propilenoglicol, por WALLENIOUS & LEKHOLM (1973), que aplicaram a solução três vezes por semana no palato com um pincel número 2.

Dilui-se também o 4NQO em água morna até se obter uma concentração de 0,001% (KITANO et al., 1992).

De acordo com as observações de SVENSSON & HEIDEN (1982) e STEIDLER & READE (1984), o período de aplicação, assim como a concentração do 4NQO influem modificando a quantidade e o tempo de aparecimento das lesões, sendo a incidência de carcinomas proporcional ao tempo de aplicação do agente carcinogênico.

2.3.3.2 LESÕES CAUSADAS PELO 4NQO EM BOCA

Ambos os métodos de administração do carcinógeno 4NQO nos ratos induzem hiperplasias, hiperqueratoses, leucoplasias, papilomas, displasias e carcinoma “in situ” no palato, língua e mandíbula (SANTOS, 1999).

Há poucos trabalhos na literatura abordando os efeitos do carcinógeno 4NQO sobre os tecidos gengivais. Tais relatos se atêm à descrição dos aspectos macroscópicos, sem abordarem a histopatologia das lesões macroscópicas. WALLENIOUS & LEKHOLM (1973) relataram lesões em gengiva inferior em três ratos dos treze tratados com 4NQO por sete meses. Já em outros locais, obtiveram maiores porcentagens de lesões, sendo 100% de presença de lesões em palato e 75% de lesões na língua. OHNE et al. (1981) relataram indução de Carcinoma Espino Celular após 7 meses de tratamento em todos os 19 ratos tratados, sendo que 18 ratos apresentaram lesões em língua, 15 no palato duro, 4 no palato mole, dois na mucosa jugal e três ratos apresentaram lesões na gengiva, sendo duas destas lesões ulceradas.

Material e Métodos

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Para o presente estudo foram utilizadas 70 ratas (*Ratus norvergicus albinus*, Wistar), jovens, pesando de 100 - 150g, tratadas com água e ração “*ad libitum*”. As ratas foram mantidas em caixas plásticas e divididas aleatoriamente em 4 grupos e submetidas aos tratamentos mostrados na tabela 1.

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

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

Durante todo o período experimental as ratas foram pesadas semanalmente.

3.2- CICLOSPORINA A (CSA)

A Ciclosporina A* armazenada em ampolas para infusão intravenosa, na concentração de 50 mg/ml, foi diluída em solução autoclavada de NaCl (0,9%) até a concentração final de 10 mg/ml. A solução de CsA foi administrada nos animais dos grupos CsA e 4NQO+ CsA, na concentração de 10mg/Kg de peso

* Sandimmun (NOVARTIS)

corporal/dia, por via subcutânea (WASSEF et al., 1985) durante todo o período experimental (240 dias).

3.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4NQO)

O Óxido de Nitroquinolina (4NQO)* diluído até a concentração final de 0,5% em propilenoglicol foi pincelado no palato das ratas, não anestesiadas, com auxílio de uma pinça anatômica e pincel nº 04, três vezes por semana, em dias alternados, após 8 dias do início da administração da CsA. A aplicação foi feita com único movimento, da região posterior para a anterior do palato. Estima-se que a quantidade do carcinógeno aplicado seja de 14 µg (FISKER et al., 1990). Após cada aplicação do carcinógeno, os animais eram privados de água por 2 horas.

Os procedimentos de aplicação foram realizados sempre por duas pessoas, uma segurando cuidadosamente o animal não anestesiado, e a outra abrindo a boca da rata e pincelando a droga. Procedimentos adicionais de controle de contaminação foram adotados visto que a droga é um potente carcinógeno. As bancadas utilizadas eram sempre forradas com papel e o mesmo descartado em lixo hospitalar contaminado.

Decorridos 240 dias (08 meses) do início do experimento, período em que se verificou o aparecimento de lesões intrabuciais, os animais foram sacrificados com injeção letal de anestésico†. A mandíbula foi retirada, e as peças

* 4-nitroquinoline-1-óxido (Sigma)

† Francotar/Vyrbaxyl – quetamina/cloridrato de xilazina (Virbac)

foram fixadas em formol tamponado (pH 7,4) a 10%. Os animais que foram a óbito antes do período estipulado de 240 dias não foram utilizados neste experimento.

3.4- OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

As peças retiradas das ratas foram analisadas e fotografadas em lupa estereoscópica Zeiss e a seguir foi feita a descrição macroscópica das lesões e anormalidades observadas na gengiva mandibular esquerda e direita, seguindo alguns critérios listados no quadro 1.

Quadro 1- Critérios de avaliação macroscópica das lesões presentes na gengiva das ratas

- | |
|---|
| 1- Aumento Gengival
2- Aumento na Rugosidade Tecidual
3- Presença de lesão branca |
|---|

As peças com presença de “aumento gengival” foram classificadas como tal ao apresentarem aspecto de aumento volumétrico da gengiva sobre a coroa, em qualquer grau.

Mandíbulas com presença de aumento na rugosidade tecidual foram avaliadas como tal ao apresentarem irregularidades teciduais de forma ou contorno, sem alteração na coloração.

As lesões brancas foram assim classificadas quando as peças apresentavam regiões irregulares com superfícies esbranquiçadas e levemente opacas.

3.5- OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

Após a avaliação macroscópica, as peças foram cuidadosamente reduzidas em hemi-mandíbulas com auxílio de lupa respeitando a localização das lesões e seus fragmentos foram processados para a inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 4 µm de espessura, montados sobre lâminas silanizadas. Os cortes foram corados com Hematoxilina/ Eosina para avaliação histomorfológica..

A análise descritiva dos padrões morfológicos dos tecidos gengivais foi realizada em microscopia de luz transmitida comumente. De acordo com os achados histológicos, as lesões foram classificadas segundo os critérios utilizados na Quadro 2.

Quadro 2. Critérios de classificação microscópica das alterações presentes nas gengivas das ratas de todos os grupos.

- | |
|--|
| 1- acantose
2- hiperqueratose
3- displasia leve
4- displasia moderada
5- displasia severa
6- carcinoma espino celular |
|--|

Nas regiões que apresentaram displasias, foram adotados os critérios de SMITH & PINDBORG (1969) para avaliação.

As alterações do epitélio displásico avaliadas foram: cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, perda de polaridade das células basais, estratificação irregular do epitélio, queratinização de células individuais ou grupos de células da camada espinhosa e perda de coesão celular típica. As alterações das células displásicas avaliadas também seguiram os critérios de SMITH & PINDBORG (1969): núcleos grandes e proeminentes, relação

núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hipercromáticos, pleomorfismo celular, aumento na atividade mitótica, presença de mitoses atípicas.

Na presença de tais alterações, era realizada a classificação quanto à intensidade displásica de acordo com os critérios propostos por VAN DER WAAL (1997):

- Displasia leve: alterações limitadas à porção basal e parabasal do epitélio.
- Displasia moderada: presença de alterações desde a camada basal até a porção média da camada espinhosa.
- Displasia severa: apresenta alterações desde a camada basal até um nível acima da porção média do epitélio.

Sempre se considerou na avaliação de um mesmo animal a lesão de maior severidade para fins de avaliação.

Resultados

4- RESULTADOS

4.1- RATAS

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

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

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

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

Foi observado menor período de sobrevida nas ratas tratadas com a associação da CsA ao 4NQO, quando comparado aos outros grupos, que não diferiram significativamente entre si, conforme observado na Tabela 3.

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

Grupo	N	Média
Controle	12	240.00 $\pm$ 0 A
CsA	14	192.42 $\pm$ 87.08 A B
4NQO	11	183.18 $\pm$ 65.30 A B
CsA+4NQO	33	142.42 $\pm$ 91.66 B

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

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significante entre as médias de ganho de peso corporal das ratas dos grupos controle, tratadas com CsA, com 4NQO ou com a associação do CsA e 4NQO, conforme ilustra a Tabela 4.

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

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

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

4.2- ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Após o término do tratamento, as gengivas das ratas do grupo controle não demonstraram alterações macroscópicas (Figura 1). A gengiva era firme, contornava a porção cervical dos dentes, terminando em forma afilada como borda de faca, com papilas interdentais nítidas assumindo formas triangulares.

As gengivas dos molares das ratas tratadas somente com CsA, nas regiões vestibular e lingual apresentavam similaridade com as gengivas dos ratos do grupo controle.

Tanto o Grupo tratado com 4NQO isoladamente como o grupo tratado com a associação do 4NQO e CsA apresentaram alterações gengivais, o que não ocorreu aos demais grupos (Tabela 5), as quais serão abordadas separadamente.

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

Grupo	Aumento do Volume Gengival	Aumento Rugosidade Tecidual	Presença de lesão branca
4NQO + CsA	76,92	69,23	46,15
4NQO	80	100	100
CsA	0	0	0
Controle	0	0	0

4.2.1- AUMENTO DO VOLUME GENGIVAL

Os aumentos de volume gengivais eram pequenos, evidentes em algumas regiões, como papila interdental. Neste caso a gengiva mostrava contorno dentário e delimitação das papilas interdentais semelhantes ao normal, porém aumentada em volume, embora muito discretamente. Tais aumentos foram observados tanto no grupo tratado somente com 4NQO quanto no grupo tratado com a associação das drogas. Observou-se que no grupo tratado com 4NQO a porcentagem foi ligeiramente superior às porcentagens observadas no grupo CsA+4NQO. As porcentagens dos grupos Controle e CsA não diferiram entre si.

4.2.2- AUMENTO NA RUGOSIDADE TECIDUAL

As rugosidades teciduais apresentaram-se geralmente na região de segundos e terceiros molares, e eventualmente de forma generalizada (Figuras 3 a 7). Foram observados aumentos na rugosidade tecidual nos grupos tratados com 4NQO isoladamente e no grupo tratado com CsA e 4NQO. Observou-se que no grupo tratado com 4NQO a porcentagem de aumento nas rugosidades teciduais foi superior a todos os grupos. O grupo tratado com a associação das

drogas apresentou porcentagem superior aos grupos Controle e CsA, cujas porcentagens não diferiram entre si.

4.2.3- PRESENÇA DE LESÕES BRANCAS

As lesões brancas eram irregulares e levemente opacas, geralmente pequenas, localizadas ou distribuídas em várias regiões da mandíbula (Figuras 3 a 7). A porcentagem de lesões brancas na gengiva das ratas tratadas somente com 4NQO foi superior à observada para o grupo tratado com CsA e 4NQO. O grupo tratado com a associação das drogas apresentou porcentagem superior aos grupos Controle e CsA, cujas porcentagens não diferiram entre si.

4.2.4- OUTRAS OCORRÊNCIAS

Também foi observado nas ratas do grupo tratado com 4NQO e nas ratas do grupo de associação de tratamentos (CsA+4NQO) a presença de lesões ulceradas, com maior ocorrência das mesmas no grupo de 4NQO isoladamente do que no grupo de associação de drogas (Figura 8). Tais lesões eram irregulares e geralmente pequenas.

Em algumas ratas do grupo 4NQO e do grupo CsA+4NQO foi observado também ligeira retração gengival (Figura 4 e 6).



Figura 1. Aspecto macroscópico da mandíbula de rata do grupo controle, sem alterações teciduais (16x).



Figura 2. Aspecto macroscópico da mandíbula de rata do grupo CsA, sem alterações teciduais (16x).



Figura 3. Aspecto macroscópico da mandíbula de animal tratado com CsA+4NQO, apresentando aumento de volume tecidual, aumento na rugosidade e presença de lesões brancas (16x).



Figura 4. Maior aumento da Figura 3, evidenciando áreas de retração gengival e lesões brancas (25x).

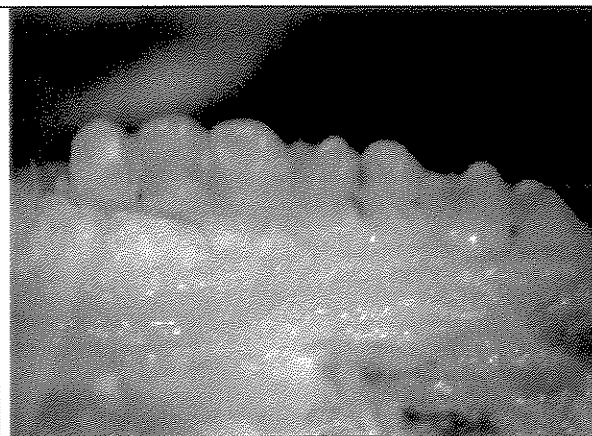


Figura 5. Aspecto macroscópico da mandíbula de animal tratado com CsA+4NQO, apresentando aumento de volume tecidual, aumento na rugosidade e presença de lesões brancas (16x).

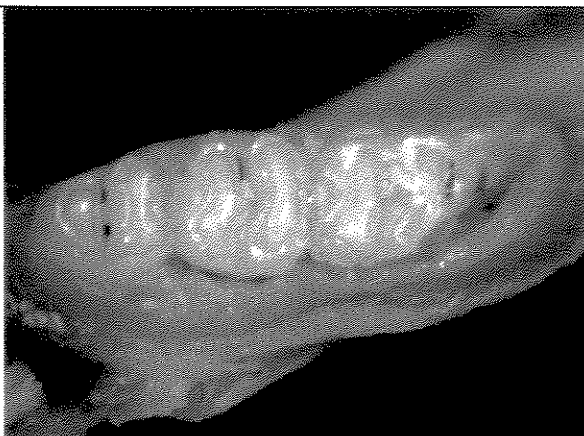


Figura 6. Aspecto macroscópico da mandíbula de animal tratado com 4NQO, apresentando aumento de volume tecidual, aumento na rugosidade e retração gengival (16x).



Figura 7. Aspecto macroscópico da mandíbula de animal tratado com 4NQO, apresentando aumento de volume tecidual, aumento na rugosidade e presença de lesões brancas (16x).



Figura 8. Aspecto macroscópico da mandíbula de animal tratado com 4NQO, observa-se extensa área ulcerada (16x).

4.3- ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Não foram verificadas alterações microscópicas de nenhum tipo nas gengivas das ratas do grupo controle. A gengiva das faces vestibular e lingual do primeiro molar inferior apresentava-se com características normais. Estava recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O epitélio sulcular era queratinizado, delgado, penetrando lateralmente em direção apical até o epitélio juncional. Este último era formado por 2-3 camadas de células epiteliais achatadas, frouxamente arrançadas e não queratinizadas.

Nos demais grupos foram observados Hiperqueratose, Acantose, e as Displasias foram classificadas como leve, moderada, severa e carcinoma. Na ocorrência de mais de um tipo de aspecto, foi considerado sempre a forma de lesão mais severa.

As ocorrências de tais achados nos grupos encontram-se ilustrados na Tabela 2, com os valores expressos em porcentagem.

Tabela 2. Alterações microscópicas presentes na gengiva das ratas dos diversos grupos, expressas em porcentagem. Os números de 1 a 6 expressam as alterações microscópicas observadas.

Grupo	1	2	3	4	5	6
4NQO + CsA	83,3	66,6	16,6	33,3	0	50,0
4NQO	100	100	0	0	0	80,0
CsA	66,6	0	0	0	0	0
Controle	0	0	0	0	0	0
1 -acantose; 2 -hiperqueratose; 3- displasia leve; 4- displasia moderada; 5- displasia severa; 6- carcinoma espino celular.						

As alterações serão abordadas uma a uma a seguir.

4.3.1- ACANTOSE

Foram observadas áreas de acantose nas ratas dos grupos tratados somente com CsA (66,6%), nas ratas tratadas com CsA+4NQO (83,3%) e na totalidade das ratas tratadas somente com 4NQO. As áreas acantóticas eram mais pronunciadas neste último grupo, sendo um pouco menos evidentes no grupo de associação dos tratamentos, e no grupo tratado somente com CsA apresentavam-se como áreas de discreta acantose. Nem sempre as áreas com acantose eram acompanhadas de hiperqueratose, por isso foram avaliadas separadamente.

Observou-se que a porcentagem de acantose nas gengivas de ratas tratadas somente com 4NQO foi superior a todos os outros grupos. Tal valor foi ligeiramente superior ao encontrado para o grupo tratado com a associação das drogas. O grupo CsA apresentou valor superior ao encontrado para o grupo controle.

4.3.2- HIPERQUERATOSE

Foram observadas áreas de hiperqueratose somente nos grupos tratados com CsA+4NQO (66,6%) e na totalidade das ratas tratadas com 4NQO. No grupo tratado somente com CsA não foi detectada a presença de hiperqueratose nas regiões observadas.

A porcentagem de hiperqueratose presente na gengiva das ratas tratadas somente com 4NQO foi superior quando comparada ao grupo tratado

com a associação das drogas. As porcentagens dos grupos Controle e CsA não diferiram entre si.

4.3.3- DISPLASIA LEVE

As displasias leves foram classificadas como tal quando apresentavam alterações limitadas às camadas basal e parabasilar. Foi detectada a presença de displasia leve no grupo CsA+4NQO (16,6%).

O grupo tratado com a associação das drogas apresentou porcentagens de presença de displasia leve superiores aos demais grupos. Os grupos Controle, CsA e 4NQO não apresentaram valores de porcentagens diferentes entre si.

4.3.4- DISPLASIA MODERADA

As displasias moderadas foram consideradas quando apresentaram alterações desde as camadas basal e parabasilar até a porção média da camada espinhosa. Foi observada a presença de displasia moderada no grupo CsA+4NQO (33,3%).

O grupo tratado com a associação das drogas apresentou porcentagens de displasia moderada superiores aos demais grupos, cujos valores não diferiram entre si.

4.3.5- DISPLASIA SEVERA

As displasias severas foram consideradas quando apresentaram alterações desde as camadas basal e parabasilar até um nível acima da porção média da camada espinhosa. Não foi observada a presença de displasia severa em nenhum dos animais examinados em todos os grupos.

4.3.6- CARCINOMA ESPINOCELULAR

Os carcinomas apresentaram-se como ilhas e cordões de células epiteliais atípicas que se caracterizavam por apresentar alterações na proporção núcleo/citoplasma, mitoses atípicas, núcleos hipercromáticos, que invadiam o tecido conjuntivo. Observou-se em alguns casos, a formação de pérolas de queratina. No grupo tratado somente com 4NQO, observou-se maior porcentagem de lesões (80%), quando comparado ao grupo tratado com CsA+4NQO (50%). De modo geral, os carcinomas que acometiam ratas tratadas somente com 4NQO apresentavam aspecto mais indiferenciado quando comparadas às lesões do grupo tratado com CsA+4NQO.



Figura 9. Aspecto microscópico da gengiva de rata do grupo controle, sem alterações epiteliais ou conjuntivas (50x).



Figura 10. Aspecto microscópico da gengiva vestibular de rata do grupo controle, sem alterações epiteliais ou conjuntivas (100x).

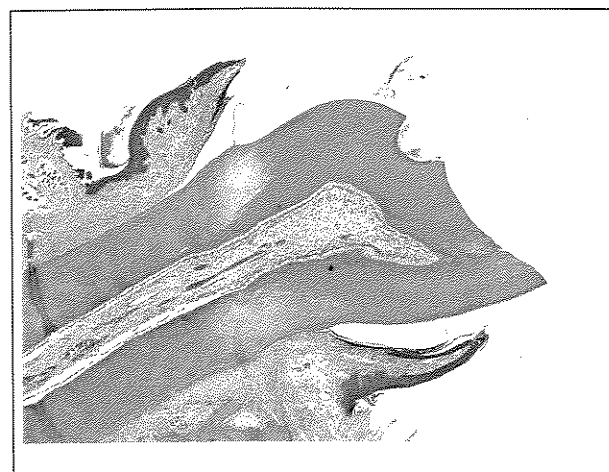


Figura 11. Aspecto microscópico da gengiva de rata tratada com CsA, com discreta acantose na face lingual (50x).

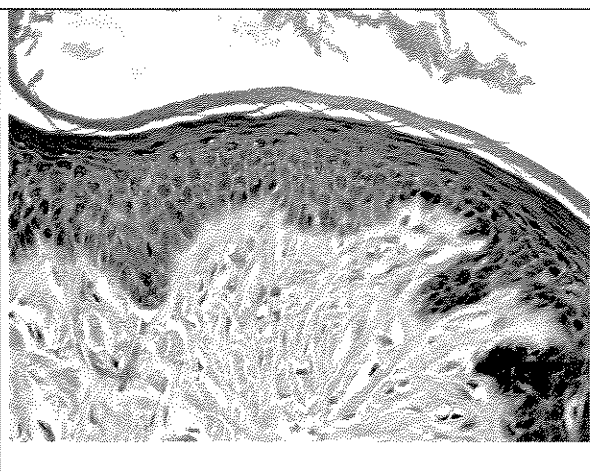


Figura 12. Aspecto microscópico da face lingual da gengiva de rata tratada com CsA, com discreta acantose (400x).

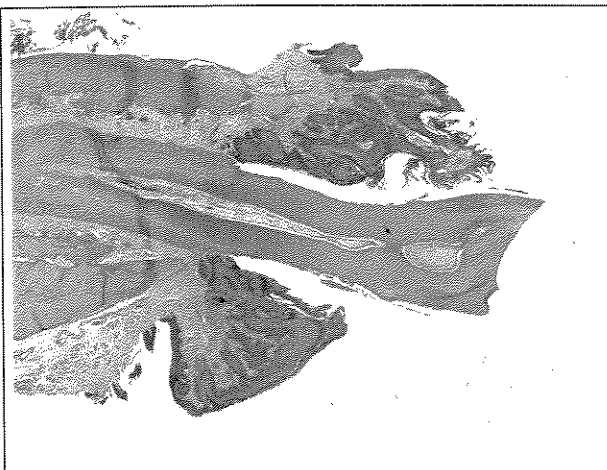


Figura 13. Aspecto microscópico da gengiva de rata tratada com CsA+4NQO, mostrando invasão de ninhos de células epiteliais para o tecido conjuntivo (50x).



Figura 14. Aspecto microscópico da face lingual da gengiva de rata tratada com CsA+4NQO, mostrando invasão de ninhos de células epiteliais para o tecido conjuntivo, pérolas de queratina, intensa hiperqueratose (100x).

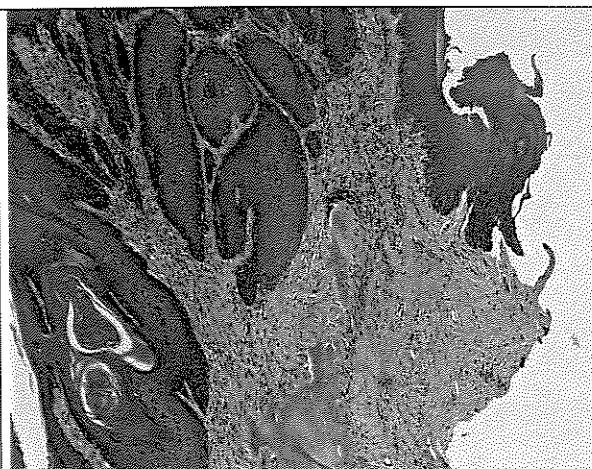


Figura 15. Aspecto microscópico da gengiva de rata tratada com CsA+4NQO, mostrando invasão de ninhos de células epiteliais para o tecido conjuntivo, pérolas de queratina (200x).



Figura 16. Aspecto microscópico da gengiva da face vestibular de rata tratada com CsA+4NQO, mostrando invasão de ninhos de células epiteliais para o tecido conjuntivo, pérolas de queratina, intensa hiperqueratose (200x).



Figura 17. Aspecto microscópico da gengiva de rata tratada com 4NQO, mostrando intensa reabsorção óssea na face lingual, causada pelo carcinoma presente na gengiva (25x).

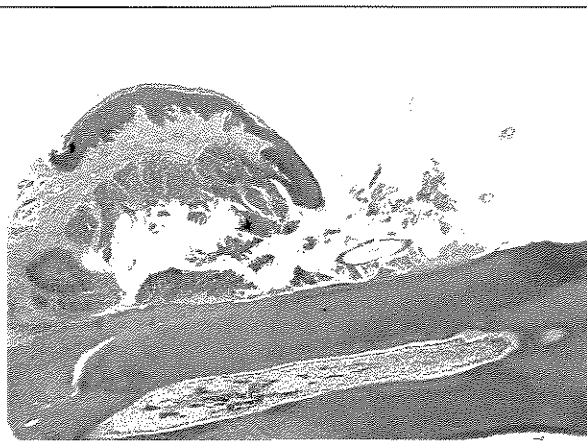


Figura 18. Aspecto microscópico da face lingual da gengiva de rata tratada com 4NQO, mostrando intensa reabsorção óssea, pérolas de queratina no interior do tecido conjuntivo (50x).



Figura 19. Maior aumento da figura anterior, mostrando desorganização da camada basal do epitélio sulcular e juncional, com infiltração do tecido conjuntivo (100x).

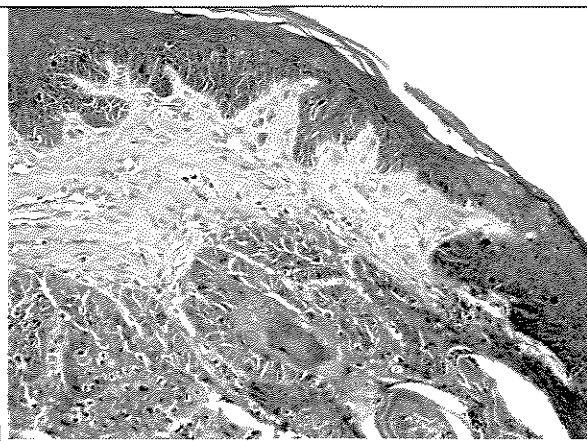


Figura 20. Maior aumento da figura anterior, evidenciando desorganização da camada basal do epitélio sulcular, fendas suprabasais, pérola de queratina e infiltração do tecido conjuntivo (200x).

Discussão

5- DISCUSSÃO

5.1 ANIMAIS

O uso de animais para estudos experimentais é um modelo válido e bem estabelecido, tanto para o estudo dos efeitos da imunossupressão pela CsA (SANGALLI et al., 1988; SPOLIDÓRIO et al., 2001), quanto para o estudo dos efeitos da carcinogênese experimental pelo 4NQO (MAKITA et al., 1996). Os ratos estão entre os animais mais utilizados e apropriados para estudos experimentais, pois apresentam estreita semelhança aos humanos no que se refere à anatomia periodontal dos dentes molares, desenvolvimento e composição da placa dental e histopatologia de lesões periodontais (KLAUSEN, 1991). Utilizamos para o presente estudo ratas da raça Wistar tendo por base o trabalho de MOLCEPERES et al. (2000), que demonstraram não haver diferenças significativas que contraindicassem o uso de ratas fêmeas em experimentos com CsA, sendo que FISKER et al. (1990) observaram as seguintes vantagens: fácil disponibilidade, animais pequenos, de fácil manuseio e com menor índice de mortalidade e doenças intercorrentes quando comparados aos ratos da raça Sprague-Dawley. As ratas Wistar mostraram-se susceptíveis à ação do 4NQO e adequadas para este modelo experimental.

5.2- CICLOSPORINA A

Diversos são os trabalhos abordando os efeitos da CsA sobre os tecidos gengivais de humanos e ratos (WY SOCKIE et al. 1983; DELILERS et al., 1986; McGAW et al., 1988; DAS et al., 2001). No presente trabalho, a CsA foi injetada no tecido cutâneo da região dorsal das ratas, na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal por dia. Tal concentração baseou-se no trabalho de WASSEF et al. (1985), que mostraram que a dose de 10mg/kg de peso corporal por dia é bem tolerada pelo animal, mantendo uma concentração sérica constante. FU et al. (1995) utilizaram doses maiores de CsA, até o valor máximo de 30 mg/kg/dia, e obtiveram valores maiores de aumentos gengivais, sugerindo que o crescimento gengival induzido por CsA seria dependente da dose.

No presente trabalho, no grupo tratado com CsA, verificou-se a morte de 4 animais (28,5%) antes do término do período total do experimento (240 dias) (NEVES, 2002), tal fato podendo ser explicado pelo uso prolongado da CsA, que em longos períodos de administração pode afetar a pele, o sistema nervoso central, o fígado e principalmente os rins (RYFFEL, 1986; MYERS, 1986).

Macroscopicamente não foi detectada nenhuma alteração tecidual nas ratas tratadas com CsA. Os aumentos gengivais, achados comuns em ratos tratados com CsA, não foram observados nas ratas deste estudo. Tal fato pode ser explicado pelo longo período experimental (240 dias) e consequentemente pela idade dos ratos. A idade tem sido relatada como fator de risco para o desenvolvimento de alterações gengivais induzidas pela CsA. Em animais, alguns estudos corroboram tal observação (DALEY et al., 1986; SCHULZ et al., 1990;

HEFTI et al., 1994; SOMACARRERA et al., 1994). MORISAKI e colaboradores (1993) submeteram ratos de 15, 30, 45 e 60 dias ao tratamento com CsA (120 a 200 microgramas/grama) por 40 dias. O grupo mais jovem (15 dias) apresentou os maiores valores de crescimento gengival, decrescendo os valores para os grupos de 30, 45 e 60 dias. Os autores concluíram que o crescimento gengival induzido por CsA é dependente da idade em ratos. Em humanos, as observações de que praticamente todos os pacientes pediátricos que receberam terapia imunossupressora com CsA desenvolveram algum tipo de alteração gengival e o número de crianças com aumento gengival maior (52%) quando comparadas a adultos, confirmam em humanos as observações feitas em animais. (ALLMAN et al., 1994; LOWRY et al., 1995; KARPINIA et al., 1996; KILPATRICK et al., 1997). Além do fator idade, parece que o fator tempo de administração da droga também apresenta influência sobre as alterações gengivais. MONTEBUGNOLI et al. (2000) monitoraram por 48 meses o estado periodontal de 21 pacientes que sofreram transplantes cardíacos e estavam recebendo terapia imunossupressora com CsA. Na primeira consulta (6 meses após o início da terapia com CsA) 7 pacientes apresentavam aumento gengival, após 12 meses tal número decresceu para 5 pacientes com aumento gengival, aos 24 meses de acompanhamento 4 pacientes e finalmente, aos 36 meses apenas 2 pacientes apresentavam aumento gengival dos 7 pacientes que inicialmente portavam tal condição. Eles sugeriram que o aumento gengival seria um efeito colateral relacionado ao tempo, com o decréscimo nos aumentos gengivais sendo atribuídos provavelmente a uma progressiva redução na sensibilidade do periodonto à CsA. Recentemente tais

dados também foram observados por HOSEY et al. (2002) em pacientes pediátricos, que notaram correlação inversa significativa entre a duração da terapia com CsA e a severidade do aumento gengival. A duração média da terapia com CsA foi de 19,7 meses (variando de 1 mês a 4 anos e 10 meses). Excetuando-se estes dois trabalhos, até o presente momento na literatura há escassez de estudos longitudinais com períodos longos de acompanhamento abordando os efeitos do tempo sobre a severidade dos aumentos gengivais.

Microscopicamente algumas ratas do grupo tratado com CsA apresentaram acantose (66,6%). As áreas acantóticas eram discretas e localizadas, sem acometimento de toda a extensão do epitélio gengival. Na literatura, não há relatos da histomorfologia de gengiva de ratos tratados com CsA por longo período, portanto não se pode comparar os resultados deste estudo com outros. Na presença de aumento gengival, as áreas de acantose são um achado histológico comum (TYLDESLEY et al., 1984; PISANTY et al., 1990; DAS, 2001). Portanto, podemos sugerir que a presença das áreas acantóticas seja remanescente dos períodos em que o crescimento gengival esteve mais pronunciado, antes da adaptação dos tecidos periodontais à exposição prolongada da droga proposta por MONTEBUGNOLI et al. (2000).

5.3- ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4NQO)

No presente estudo, diluiu-se o óxido de nitroquinolina (4NQO) até a concentração final de 0,5% em propilenoglicol, sendo pincelado no palato das ratas não anestesiadas, 3 vezes por semana. Este protocolo de carcinogênese

experimental baseou-se no modelo de WALLENIOUS & LEKHOLM (1973). Os animais eram privados de água por 2 horas após a aplicação do carcinógeno.

Neste grupo, houve a morte de 5 ratas (45,4%) antes do término do período experimental de 240 dias. Tal número de perda de animais ocorreu devido ao tempo prolongado, porém necessário, de aplicação do carcinógeno. A debilidade dos animais verificou-se pelo menor ganho de peso quando comparado aos grupos controle e CsA (NEVES, 2002), debilidade esta provocada por um possível aumento na dificuldade de ingestão de alimentos oriunda do aparecimento das lesões na boca (palato e língua), fato também observado por STEIDLER & READE (1984).

Macroscopicamente, foi observado discreto aumento de volume gengival nas ratas deste grupo. Tais aumentos eventualmente poderiam estar sendo provocados pela reação tecidual ao carcinógeno, ou pela presença de carcinoma espino-celular, confirmada posteriormente pela análise microscópica. Aumento na rugosidade tecidual, lesões brancas e úlceras também foram observadas. Tais achados são comumente relatados na literatura, porém em outros sítios, como palato e língua. Os achados em tecido gengival ocorreram em menor número quando comparados ao palato e língua (NEVES, 2002). Uma possível razão para esta ocorrência pode ser a maior distância dos tecidos gengivais inferiores à área de aplicação do carcinógeno, portanto, recebendo menores quantidades do mesmo e em menor concentração. Na literatura, poucos autores relatam os achados em tecido gengival. WALLENIOUS & LEKHOLM (1973) relataram obtenção de lesões em gengiva inferior em 3 ratos de 13 tratados,

porém o período de aplicação foi inferior ao do presente estudo. Não realizaram a descrição macroscópica dos achados em tecido gengival dos ratos tratados. OHNE et al. (1981) também relataram presença de lesões em gengiva de 3 ratos de 19 tratados, sendo que duas destas lesões eram do tipo ulcerado; contanto, o período de aplicação e método de administração da droga diferiram dos adotados no presente estudo. Outro achado macroscópico (porém não quantificado) foi a presença de áreas de retração gengival.

Microscopicamente no presente estudo, foi observada a presença de acantose e hiperqueratose em todos os animais avaliados. Tais achados se devem ao efeito irritante do carcinógeno sobre o epitélio, e é considerado nestes tipos de estudo como um estágio precoce no processo de carcinogênese (FISKER et al., 1990). As áreas de hiperqueratose no epitélio sulcular, que normalmente apresentam queratina, apresentaram nestes animais uma abundante queratinização, diferindo do padrão normalmente observado. No epitélio gengival oral também foi notada a presença de hiperqueratose, mais observada na face lingual dos dentes molares. Uma possível explicação para tal fato seria a maior presença de carcinógeno na face lingual, oriunda do palato e língua, regiões em que, devido ao método de aplicação, ocorre maior concentração do 4NQO.

Os carcinomas espinocelulares observados eram bem diferenciados, com presença de grande quantidade de queratina e pequena invasão do tecido conjuntivo subjacente. Também foram observadas as presenças de pérolas de queratina. Observou-se também em alguns animais a presença de fendas suprabasais. A presença das lesões de carcinoma espinocelular foi mais freqüente

na face lingual dos animais, da mesma forma que as lesões de carcinoma de maior severidade foram encontradas nesse sítio. Tais achados não podem ser comparados à literatura devido à inexistência de trabalhos avaliando os efeitos do 4NQO sobre a histologia dos tecidos gengivais.

5.4- CICLOSPORINA A ASSOCIADA AO ÓXIDO DE NITROQUINOLINA

O protocolo para aplicação neste grupo seguiu os protocolos de aplicação das drogas individualmente, descritos anteriormente.

Neste grupo houve os maiores números de perda em relação aos outros grupos, morreram 19 animais (57,6%) antes do término do período experimental (240 dias). Tal fato deveu-se provavelmente aos efeitos da administração de longo termo da CsA, já abordada anteriormente no capítulo de tal droga, associada aos efeitos carcinogênicos do 4NQO, também abordados no respectivo capítulo. As mortes deveram-se à exacerbação das lesões que levaram à morte as ratas dos grupos tratados com tais drogas individualmente.

Macroscopicamente foi observado um discreto aumento no volume tecidual gengival, devido à ação irritante do 4NQO, e em alguns casos, devido à presença de carcinoma confirmada posteriormente pela avaliação microscópica. Aumento na rugosidade tecidual, principalmente na regiões linguais de segundos e terceiros molares foram observadas também. Lesões brancas e úlceras também foram observadas.

Microscopicamente observou-se a presença de hiperqueratose e acantose, ocorridas provavelmente devido ao efeito irritante do 4NQO, porém tais

achados foram menos freqüentes e mais brandos quando comparados ao grupo tratado somente com 4NQO. Observou-se a presença de displasia leve, moderada e carcinomas, porém em menor quantidade em comparação ao grupo que recebeu somente Óxido de Nitroquinolina. Os carcinomas observados eram bem diferenciados, com presença de grande quantidade de queratina e pequena invasão do tecido conjuntivo subjacente. Também foram observadas pérolas de queratina. Tanto as displasias quanto os carcinomas acometiam mais a face lingual dos animais, possivelmente pela maior concentração do cacinógeno nestes sítios, pelos motivos anteriormente abordados.

Os achados não podem ser comparados à literatura e discutidos devido à inexistência de trabalhos avaliando os efeitos da combinação da CsA com o 4NQO sobre a histologia dos tecidos gengivais.

5.5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Os achados macroscópicos e microscópicos dos grupos controle e CsA praticamente não diferiram entre si, exceto pela observação de acantose em alguns animais do grupo CsA. Tal ocorrência foi abordada no respectivo capítulo. De modo geral, a administração de CsA por longo período não provocou nos tecidos gengivais o surgimento de nenhuma anormalidade, nem mesmo de neoplasias.

Já os grupos tratados com CsA e CsA+4NQO apresentaram aspectos macroscópicos e microscópicos que demonstram os efeitos do 4NQO e da CsA sobre os tecidos gengivais. A menor ocorrência de achados macroscópicos e

microscópicos no grupo de associação de tratamentos quando comparadas ao grupo tratado somente com 4NQO, nos levam a sugerir que a administração de CsA por longo tempo tenha causado alterações nas células tanto do tecido conjuntivo como do epitélio. Níveis aumentados de certos fatores de crescimento e/ou seus receptores estão comumente envolvidos em aumentos de volume teciduais, tais como o crescimento gengival induzido pela CsA (BUDUNELI et al., 2001; COTRIM et al., 2002). Dentre tais fatores, sugere-se que o fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de crescimento transformante (TGF) desempenhem importante papel tanto no mecanismo de aumento gengival quanto na progressão de neoplasias (GAME et al., 1990). Pelo fato de o grupo tratado com CsA não ter apresentado crescimento gengival após 240 dias de aplicação da droga, sugerimos um mecanismo de adaptação periodontal à droga, hipótese proposta por MONTEBUGNOLI et al. (2000). Tal mecanismo pode ser uma diminuição na responsividade das células envolvidas no aumento de volume tecidual (fibroblastos, queratinócitos) aos fatores de crescimento. Da mesma forma que no grupo tratado somente com CsA, tal droga pode ter causado semelhante adaptação das células aos fatores de crescimento no grupo tratado com a associação das drogas, causando uma diminuição na responsividade celular aos fatores de crescimento, diminuindo portanto a progressão tumoral induzida pelo 4NQO. Tal fato explicaria a menor ocorrência de neoplasias no grupo CsA+4NQO quando comparado ao grupo tratado somente com CsA.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Considerando-se as limitações do presente estudo, concluímos que:

- A associação da Ciclosporina A ao Óxido de Nitroquinolina, na gengiva das ratas tratadas não aumentou o número de alterações macroscópicas.
- A associação da Ciclosporina A ao Óxido de Nitroquinolina, na gengiva das ratas tratadas não aumentou o número de alterações microscópicas.

Portanto, para o presente estudo pode-se concluir que na gengiva das ratas tratadas a imunossupressão pela Ciclosporina A não exacerbou o processo de carcinogênese bucal experimental.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALLMAN SD, MCWHORTER AG, SEALE NS. Evaluation of cyclosporin-induced gingival overgrowth in the pediatric transplant patient. **Pediatric Dentistry** 1994,16:36-40.
- ANDRES D, CASCALES M. Novel mechanism of Vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. **Biochem Pharmacol** 2002, 64(2):267-76.
- ATKINSON K, BIGGS JC, BRITTON K. Distribution and persistence of cyclosporin in human tissues. **Lancet** 1982; 2:1165.
- BARTHELEMY H, FRAPPAZ A, CAMBAZARD F, et al. Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporine. **J Am Acad Dermatol** 1993; 18:1262-6.
- BIRKELAND SA. Cancers in transplanted patients - the Scandia-transplanted material. **Transplant Proc** 1983, 15:1071-8.
- BOLTCHI FE, REES TD, IACOPINO AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. **Quintessence Int.** 1999,30:775-83.
- BONNAURE-MALLET et al., Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. **Arch Oral Biol.** 1995, 40:393-400.

¹Abreviaturas de periódicos de acordo com o MedLine.

- BONNE C. Sur la presence de papilomes sur les muqueuses d'animaux badigeonnés au goudron. **Comptes Rendus Societe de Biologie**, 1925, 93: 907. In EVESON, JW Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. **J Oral Pathol** 1981, 10:29-46.
- BOREL JF, FEURER C, GUBLER HV. Biological effects of cyclosporin. A new antilymphocyte agent. **Agents and Action** 1976, 6: 468-75.
- BRINKMEIER T, FROSCH PJ. Pyodermatites – pyostomatitis vegetans: a clinical course of two decades with response to cyclosporine and low-dose prednisolone. **Acta Derm Venereol** 2001, 81 (2): 134-6.
- BUDUNELI N et al. Immunohistochemical analysis of epidermal growth factor receptor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. **Acta Odontol Scand**. 2001,59:367-71.
- BUEDING E, HAWKINS J, CHA YN. Antischistosomal effects of cyclosporin A. **Agents and Actions** 1981, 11:380-3.
- BUONPANE E. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. **Connecticut Medicine** 1990, 54: 17-9.
- CALNE RY, WHITE DJ, PENTLOW BD, ROLLES K, SYRAKOS T, OHTAWA T, SMITH DP, MC MASTER P, EVANS DB, HERBERTSON BM, THIRU S. Cyclosporin A: preliminary observations in dogs with pancreatic duodenal allografts and patients with cadaveric renal transplants. **Transplant Proc**. 1979, Mar;11(1):860-4.

- CARP JM, ONUMA E, DAS K, et al. Intravenous cyclosporine therapy in the treatment of pyoderma gangrenosum secondary to Crohn's disease. **Cutis** 1997, 60: 135-8.
- CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. **Nature** 1992, 357:695-7.
- CORTES J, O'BRIEN S, LOSCERTALES J et al. Cyclosporin A for the treatment of cytopenia associated with chronic lymphocytic leukemia. **Cancer** 2001, 92 (8): 2016-22.
- COTRIM P, de ANDRADE CR, MARTELLI-JUNIOR H, GRANER E, SAULK JJ, COLETTA RD. Expression of Matrix Metalloproteinases in Cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 Autocrine Stimulation. **J Periodontol** 2002, 73: 1313-1322.
- DALEY TD, WYSOCKY GP, COLIN DHB. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine induced gingival hyperplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1986, 62 417-21.
- DALEY TD, WYSOCKY GP. Cyclosporin therapy **J Periodontol** 1984, 55(12): 708-12.
- DAS JS, PARKAR MH, OLSEN I. Upregulation of keratinocyte growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. **J Periodontol** 2001, 72:745-752.
- DELILERS GL, SANTORO F, POLLI N, et al. Light and electron microscopic study of cyclosporin A induced gingival hyperplasia **J Periodontol** 1986, 57: 771-5.

- EISEN D, ELLIS CN, DUELL EA, et al. Effect of a topical cyclosporine rinse on oral lichen planus: a double-blind analysis. **N Engl J Med** 1990, 323: 290-4.
- EJSTRUT L. Severe dermatomyositis treated with cyclosporin A. **Ann Reum Dis** 1986, 45: 612-3.
- ELGART G, STOVER P, LARSON K, et al. Treatment of pyoderma gangrenosum with cyclosporine: results in seven patients. **J Am Acad Dermatol** 1991, 24:83-6.
- FEUTREN G, QUERIN S, TRON F, et al. The effects of cyclosporine in patients with systemic lupus. **Transplant Proc** 1986, 18: 643-4.
- FISKER AV, WEST MJ, PHILIPSEN HP, et al. Quantification of oral epithelial hiperplasia in rats after topical application of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. **Acta Odontol Scand** 1990, 48:125-31.
- FU E. et al., Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. **Journal of Periodontology** 1995, 66(7): 594-598.
- FUJINO H, CHINO T, MAI T. Experimental production of labial and lingual carcinomas in hamsters by local application of 4-nitroquinoline n-oxide. **Nat Cancer Inst** 1965, 35: 907-18.
- FUJITA K; KAKU T; SDASAKI M, et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene. **J Dent Res** 1973, 52(2): 327-32.
- GAME SM et al. Tumour progression in experimental oral carcinogenesis is associated with changes in EGF and TGF-beta receptor expression and altered responses to these growth factors. **Carcinogenesis**. 1990,11:965-73.

- GIJTENBEEK JMM, VANDEN BENT MJ, VECHT CH. Cyclosporine neurotoxicity: a review. **J Neurol** 1999, 246: 339-46.
- GOULON M, ELKHARRAT D, GAJDOS P. Treatment of severe myasthenia gravis with cyclosporin. A 12-month open trial. **Presse Med** 1989, 18: 341-6.
- GUPTA S, KESHAVARZIAN A, HODGSON HJF. Cyclosporin in ulcerative colitis **Lancet** 1984, 2:1277-8.
- GURECKI J, WARTY V, SANGHVI A. The transport of cyclosporine in association with plasma lipoproteins in heart and liver transplant patients. **Transplant Proc.** 1985,17:1997-2002.
- HARDESTY RL, GRIFFITH BP, DEBSKI RF, et al. Experience with cyclosporine in cardiac transplantation. **Transplant Proc** 1983, 15: 2553-8.
- HARPENAU LA, PLEMONS JM, REES TD. Effectiveness of a low dose of cyclosporine in the management of patients with oral erosive lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1995, 80: 161-7.
- HASSAN MMA, SHKLAR G, SOLT D, et al. Acute effect of DMBA application on mitotic activity of hamster buccal pouch epithelium. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1985, 59: 491-8.
- HEFTI AF, ESHENAUER AE, HASSELL TM, STONE C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. **Journal of Periodontology** 1994, 65: 744-749.
- HOJO M, MORIMOTO T, MALUCIO M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. **Nature** 1999, 397:530-4.

- HOLT DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs in kidney transplantation. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 2002,11(6):657-63.
- HOSEY MT, et al. Cytomegalovirus and cyclosporin-induced gingival overgrowth in children with liver grafts. **Int J Paediatr Dent**. 2002, 12(4):236-43.
- HUGHES AP, JACKSON JM, CALLEN JP. Clinical features and treatment of peristomal pyoderma gangrenosum. **JAMA** 2000, 284: 1546-8.
- JACOBS C, BRUNNER FP, BRYNGER M, et al. Malignant diseases in patients treated by dialysis and transplantation in Europe. **Transplant Proc** 1981, 13:729-32.
- JACOBSON DA, VOGELSANG GB. Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD. **Drugs** 2002,62(6):879-89.
- JAMES JA, IRWIN CR, LINDEN GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporin A transforming growth factor- β 1. **J Periodont Res** 1998, 33:40-8.
- JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M. Immunobiology, 5th edition, Garland Publishing, New York, 2001. Acessado da Internet no endereço eletrônico: www.ncbi.nlm.nih.gov, em 30 de Setembro de 2002.
- JENSEN JR, THESTRUP-PEDERSEN K, ZACHARIAE H, et al. Cyclosporin A therapy for mycosis fungoides. **Arch Derm** 1987, 123: 160-3.
- JOHN GT, VINCENT L, JEYASEELAN L, et al. Cyclosporine immunosuppression and mycobacterial infections. **Transplant** 1994, 58: 247-9.
- KAHAN BD. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. **Transpl Proc** 1989, 21: 1725-38.

- KAMHOLZ SL, VEITH FJ, MONTEFUSCO CM, et al. Single lung transplantation with cyclosporine immunosuppression. **Transplant Proc** 1983, 15: 2578.
- KARPINIA KA, MATT M, FENNELL RS, HEFTI AF. Factors affecting cyclosporine-induced gingival overgrowth in pediatric renal transplant recipients. **Pediatric Dentistry** 1996, 18:450-455.
- KAWAZOE Y, et al. Metabolism of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in mice. *Gann*. 1970,61(6):593-6.
- KEMME DJ, BUNN PA Jr. State of the art therapy of mycosis fungoides and Sezary syndrome. **Oncology** (Hunting) 1992, 6 (8): 41-42.
- KEOWN PA et al. Immunological and pharmacological monitoring in the clinical use of cyclosporin A. **Lancet**. 1981 1:686-9.
- KEOWN PA et al. The effects and side effects of cyclosporine: relationship to drug pharmacokinetics. **Transplant Proc**. 1982 14:659-61.
- KILPATRICK NM, WEINTRAUB RG, LUCAS JO, SHIPP A, BYRT T, WILKINSON JL. Gingival overgrowth in pediatric heart and heart-lung transplant recipients. **Journal of Heart & Lung Transplantation** 1997,16:1231-1237.
- KING GN, HEALY CM, GLOVER MT, et al. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1994, 78:718-26.
- KITANO M, HATANO H, SHISA H. Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide induced tongue carcinoma in rats. **Jpn J Cancer Res** 1992, 83: 843-80.

- KLAUSEN B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol** 1991, 62:59-73.
- KOBASHIGAWA JÁ. Advances in immunosuppression for heart transplantation. **Adv Card Surg.** 1998,10:155-74.
- LINDHE J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3.a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999. Pp. 3-4.
- LISTGARTEN MA. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. **Journal of Periodontology**, 1975, 46(11):677-80.
- LOWRY LY, WELBURY RR, SEYMOUR RA, WATERHOUSE PJ, HAMILTON JR. Gingival overgrowth in paediatric cardiac transplant patients: a study of 19 patients aged between 2 and 16 years. **International Journal of Paediatric Dentistry** 1995, 5:217-222.
- MAKITA H et al., Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone and quercetin. **Cancer Res** 1996, 56:4904-4909.
- MATHIESON PW. Cyclosporin: nephro-protective as well as nephrotoxic? **Clinical and Experimental Immunology** 2000, 121 (2): 179-80.
- MAURER G et al., Disposition of cyclosporine in several animal species and man. I. Structural elucidation of its metabolites. **Drug Metab Dispos.** 1984,12:120-6.

- McGAW WT, PORTER H, EDMONTON BS. Cyclosporin induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1988, 65(2): 186-190.
- MERTIN J, KNIGHT SC, RUDGE P, et al. Double blind controlled trial of immunosuppression in treatment of multiple sclerosis. **Lancet** 2: 949-51; 1980.
- MILAHOV M, GATTUSO P, ABRAHAM K, et al. Incidence of post-transplant malignancy among 674 solid-organ-transplant recipients at a single center. **Clin Transplant** 1996, 10: 248-255.
- MIN DI, MONACO AP. Complications associated with immunosuppressive therapy and their management. **Pharmacotherapy** 1991, 11: 119-125.
- MONTEBUGNOLI L, et al. The role of time in reducing gingival overgrowth in heart-transplanted patients following cyclosporin therapy. **J Clin Periodontol.** 2000,27(8):611-4.
- MOLCEPERES J, CHACÓN M, GUZMÁN M et al. Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. **International Journal of Pharmaceutics** 2000, 197:129-41.
- MORISAKI I, KITAMURA K, KATO K, MARUKAWA Y, MIHARA J. Age dependency of cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. **Pediatric Dentistry** 1993, 15: 414-417.
- MORRIS PJ. The impact of cyclosporin A. **Transplant** 1981, 32: 349-54.

- MOSER MA. Options for induction immunosuppression in liver transplant recipients. **Drugs**. 2002,62(7):995-1011.
- MULLER W, HERRMANN B. Cyclosporin A for psoriasis **New Engl J Med** 1979, 301:555.
- MYERS BD. Cyclosporine nephrotoxicity **Kidney Int** 1986, 30: 964.
- MYRILLAS TT, LINDEN GJ, MARLEY JJ, et al. Cyclosporin A regulates interleukin-12 and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. **J Periodontol** 1999, 70: 294-300.
- NAGAO M, SUGIMURA T, Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Adv Cancer Res** 1976, 23: 131-67.
- NAKAHARA W, FUKUOKA F, SUGIMURA T. Carcinogenic actions of 4-nitroquinoline N-oxide. **GAAN**, 1957, 48:129-37.
- NAMYSLOWSKI G, RELIGA Z, STESZEWSKA U, et al. A case of laryngeal carcinoma as a result of immunosuppressive therapy with cyclosporin A following heart transplantetion. **Otolaryngol Pol** 1994, 48: 72-4.
- NABEL GJ. A transformed view of cyclosporine. **Nature**. 1999, 397(6719):471-2.
- NAUTA JM, ROODENBURG JLN, NIKKELS PGJ, et al. Comparison of epithelial dysplasia – the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1995, 24: 53-8.
- NEVES KA. Efeito da imunossupressão pela ciclosporina A (CsA) sobre a carcinogênese pelo 4NQO nos tecidos bucais de ratos. (Tese de Mestrado) 128p. Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Piracicaba – SP 2002

- NIEH S, FU E, HSIEH YD, et al. Effects of cyclosporin A on the mandibular condylar cartilage in rats. **Arch Oral Biology** 1999, 44: 693-700.
- NISHIKAWA S et al., Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. **J Periodontol** 1996, 67:463-471.
- NUSSEMBLATT RB, PALESTINE AG, CHAN C, et al. Effectiveness of cyclosporine therapy for Behçet's disease. **Arthritis Rheum** 1985, 28: 671-9.
- OCHIAI E, SEI SJ. **J Pharmac Soc Japan**. 1945, 65: 18. In: NAKAHARA W, FUKUOKA F, SUGIMURA T. Carcinogenic actions of 4-nitroquinoline N-oxide. **GAAN**, 1957, 48:129-37.
- ODOM RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. **J Am Acad Dermatol** 1994, 31:556-9.
- OHNE M, et al., Induction of squamous cell carcinoma in the oral cavity of rats by oral administration of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in drinking water. A preliminary report. **Bull Tokyo Dent Coll**. 1981,22:85-98.
- OLIVARI MT, DIEKMAN RA, KABO SH, et al. Low incidence of neoplasia in heart and heart-lung transplant recipients receiving triple-drug immunosuppression. **J Heart Transplant** 1990, 9: 618-621.
- PALESTINE AG, NUSSEMBLATT RB, CHAN C. Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation. **Am J Med** 1984, 77: 652-6.
- PARODI A, REBORA A. Topical cyclosporine in alopecia areata. **Arch Dermatol** 1987, 123: 165-6.
- PENN I. Cancers following cyclosporin therapy. **Transplant** 1987, 43:32-5.

- PISANTY S, SHOSHAN S, CHAJEK T et al., The effect of cyclosporin A (CsA) treatment on gingival tissue of patients with Behçet's disease. **J Periodontol** 1990, 59:599-603.
- RATEITSCHAK-PLÜSS EM et al., Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. **J Clin Periodontol** 1983, 10:237-246.
- REBUCK AS, ATILLER CR, BRAUDE AC, et al. Cyclosporin for pulmonary sarcoidosis. **Lancet** 1984, 1:1174.
- REGEV E, ZELTER R, LUSTMAN J. Lip carcinoma in renal allograft recipient with long-term immunossuppressive therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1992, 73: 412-4.
- ROSS PJ, NAZIF MM, ZULLOT F, et al. Effects of cyclosporin A on gingival status following liver transplantation. **J Dent Children** 1989, 1: 56-9.
- RYFFEL B, DONATSCH P, MADÖRIN M. Toxicological evaluation of cyclosporin A. **Arch Toxicol** 1983, 53: 107-41.
- SALLEY JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. **J Dent Res** 1954, 33(2): 253-62.
- SANGALLI L, BORTOLOTTI A, JIRITANO L, et al. Cyclosporine pharmacokinetics in rats and interspecies comparison in dogs, rabbits, rats and humans. **Drug Metabol Disposition** 1988, 16: 749-53.
- SANTOS EB. Efeitos da xerostomia e do tratamento com 4NQO no desenvolvimento de candidose na língua de rato. Piracicaba - SP, 1999 (Tese de Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

- SCHROEDER HE. Oral structure biology : embryology, structure, and function of normal hard and soft tissues of the oral cavity and temporomandibular joints. Thieme Medical Publishers, Inc. New York, 1991. Pp. 230-260.
- SEYMOUR RA, JACOBS DJ. Cyclosporin and the gingival tissue. **J Clin Periodontol** 1992, 19:1-11.
- SEYMOUR RA, SMITH DG. The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. **J Clin Periodontol** 1991, 18:107-110.
- SEYMOUR RA, THOMASON JM, NOLAN A. Oral lesions in organ transplant patients. **J Oral Pathol Med** 1997, 26:297-304.
- SHIN GT et al. In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. **Transplantation**. 1998,65:313-8.
- SIEGAL B, LIVINTON-KRISS S, SCHIFFER A, et al. Kaposi's sarcoma in immunosuppression. **Cancer** 1990, 65:492-8.
- SMITH CJ, PINDBORG JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. 1969, Copenhagen: C. Hamburger.
- SOMACARRERA ML, HERNANDEZ G, ACERO J, MOSKOW BS. Factors relating to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. **Journal of Periodontology** 1994, 65: 671-675.
- SPOLIDORIO LC, MERZEL J, VILLALBA H, et al. Morphometric evaluation of gingival overgrowth and regression caused by cyclosporin in rats. **J Periodont Res** 2001, 36: 384-9.

- STEIDLER NE, READE PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1-oxide **Oral Surg Oral Pathol Oral Med** 1984, 57: 524-31.
- STEIMULLER DR. Cyclosporine and organ transplantation. *Cleve Clin Q* 1985, 52:263-70.
- STILLER CR, LAUPACIS A, KENOW PA, et al. Cyclosporine: Action, pharmacokinetics and effect in the BB rat model. **Metabolism** 1983, 32: 69-72.
- SUGANO N, ITO K, MURAI S. Cyclosporin A inhibits collagenase gene expression via AP-1 and JNK suppression in human gingival fibroblasts **J Periodontol Res** 1998, 33: 448-52.
- SUGIMURA T, OKABE K, ENDO H. The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rat liver and hepatomas. **Cancer Res.** 1966,26:1717-21.
- SULLIVAN KM. Graft-versus-Host-Disease. In: Forman SJ, Blumen KG, Thomas ED, eds. **Hematopoietic Cell Transplantation**. Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications. 1999, 515-536.
- SVENSSON S, HEYDEN G. Experimental induction of irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. **Int J Oral Surg** 1982, 11 52-8.
- TANAKA T, et al. A novel immunosuppressive drug, FTY720, prevents the cancer progression induced by cyclosporine. **Cancer Lett** 2002, 181: 165-171.
- THIVOLET J, BARTHELEMY H, RIGOT-MULLER G, et al. Effects of cyclosporine on bullous pemphigoid and pemphigus. **Lancet** 1985, 1: 334-5.

- THOMAS DW, SEDDON SV, SHEPHERD JP. Systemic immunosuppression and oral malignancy: a report case of review of literature. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1993, 31:391-3.
- THOMMEN SK. Antimalarial activity of cyclosporin A. **Agents and Action** 1981, 11: 770-3.
- TYLDESLEY WR, ROTTER E. Gingival hyperplasia induced by cyclosporin A. **Br Dent J** 1984, 157:305-309.
- VAN DER WAAL I, SCHEPMAN KP, VAN DER MEIJ LE, et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncology** 1997, 33: 291-301.
- VAN JOOST TH, STOLZ E, HUELE F. Efficacy of low dose cyclosporine in severe atopic skin disease. **Arch Dermatol** 1987, 123: 166-7.
- VOLPE A, DOMINGUES MG, et al. Hiperplasia gengival induzida pela ciclosporina: estudo clínico e histopatológico. **RPG** 1997, 4(2): 133-140.
- VON GRAFFENRIED B, KRUPP P. Side effects of cyclosporine (Sandimmun) in renal transplant recipients and in patients with autoimmune disease. **Transplant Proc** 1986, 18: 876-83.
- WALLENIOUS K, LEKHOLM U. Oral cancer in rats induced by water-or-fat-soluble carcinogens. **Odont. Revy** 1973, 24:115-26.
- WASSEF R, COHEN Z, LAUGER B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats - influence of route of administration and dosage. **Transplant** 1985, 40(5): 483-93.
- WIERNIK PH, DUTCHER JP, LEAF AN, et al. Objective response of multiple myeloma to cyclosporin A. **Leuk Lymph** 1994, 16: 167-70.

WYSOCKI GP et al., Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin a therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1983, 55:274-278.

YAMADA T, MOGI M, KAGE T, et al. Enhancement by cyclosporin A of metastasis from hamster cheek pouch carcinoma. **Archs Oral Biol** 1992, 37:593-6.

YAMAMOTO T, KATAYAMA I, NISHIOKA K. Adenocarcinoma of the mouth in a patient with psoriasis under short-term cyclosporine therapy. **Dermatol** 1996, 193: 72-3.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 366-2 sobre "EFEITO DA IMUNOSUPRESSÃO PELA CICLOSPORINA A (CSA) SOBRE A CARCINOGENESE PELO 4-NDO (OXIDO DE NITROQUINOLINA) NO TECIDO GENGIVAL DE RATOS."

sob a responsabilidade de Prof. DR. LUIS CARLOS SPOLDORE

está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 5.1.7.2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, entitled "

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 5.1.7.2002.

(d) (m) (y)

Campinas, 20 de Outubro de 2002

Helentirio

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Armando Ferreira Lima

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEPHONE 55 19 37887116
FAX 55 19 32893124