UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE QUANTITATIVA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES (NORs) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
DESENVOLVIDOS EM HAMSTERS A PARTIR DO MODELO
DMBA-INDUÇÃO COM AGENTES CLAREADORES DENTAIS**

DAYSE APARECIDA PIEROLI

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o Título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

São Paulo
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE QUANTITATIVA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES (NORs) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
DESENVOLVIDOS EM HAMSTERS A PARTIR DO MODELO
DMBA-INDUÇÃO COM AGENTES CLAREADORES DENTAIS**

DAYSE APARECIDA PIEROLI

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o Título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora:

Profa. Dra. Míriam Lacalle Turbino

São Paulo

2003

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pieroli, Dayse Aparecida

Análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares (NORs) em carcinomas epidermóides desenvolvidos em hamsters a partir do modelo DMBA-indução com agentes clareadores dentais / Dayse Aparecida Pieroli; orientador Miriam Lacalle Turbino. -- São Paulo, 2003.

86p.: fig., tab.; 30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Substâncias e produtos especializados – Clareadores dentais – Carcinoma epidermóide – Avaliação 2. Mucosa oral – Clareadores dentais – Potencial carcinogênico – Avaliação 3. Clareamento de dente 4. Carcinoma epidermóide

CDD 617.675

BLACK D36

Data da defesa: 09/09/2003

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr.: Miriam Lacalle Turbino.....

Julgamento: AprovadaAssinatura:.....

Prof. Dr.:Adriana Bona Matos.....

Julgamento: AprovadaAssinatura:.....

Prof. Dr.: Vera Cavalcanti de Araújo

Julgamento: AprovadaAssinatura:.....

Prof. Dr.: Maria Fidela de Lima Navarro

Julgamento: AprovadaAssinatura:.....

Prof. Dr.: Ricardo Alves de Mesquita

Julgamento: AprovadaAssinatura:.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Primeiramente à Deus que me guia todos os passos e que me dá coragem e discernimento no meu Caminho.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo sempre constantes, me fazendo acreditar nas minhas possibilidades e que tudo com dedicação é possível.

Ao meu marido e companheiro Ênio sempre incentivando e apoiando minha realização profissional. Agradeço por estar sempre ao meu lado e compreendendo a importância de realizar este trabalho.

Aos meus filhos Gabriel e Giulia, por serem o maior presente de Deus que poderíamos receber. Agradeço todos os dias de minha vida por tê-los como filhos e espero como mãe cumprir a missão a mim confiada.

À minha irmã e família pelo apoio nas horas difíceis. Apesar da distância física ser longa estamos sempre unidos pelo carinho.

Aos meus sogros, cunhados(as) pelo apoio e incentivo constantes na minha vida profissional e pessoal.

“Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.

Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.”

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo, por me receber e acolher no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Eustáquio Afonso Araújo, Vice-Reitor da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, pela atenção, confiança e apoio na realização deste meu trabalho.

À Profa. Lea Souki, Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, pelo apoio e incentivo a mim dispensados.

Ao Departamento de Dentística e Endodontia da Faculdade de Odontologia de São Paulo, aos professores e funcionários atenciosos, que com muita paciência e boa vontade sempre me atenderam.

Ao Departamento de Patologia Bucal que me recebeu com carinho, atenção e paciência. Aos professores e funcionários que me atenderam em todos os momentos solicitados e me fizeram, literalmente, me sentir acolhida.

À Profa. Dra. Míriam Lacalle Turbino pela orientação, amizade, compreensão e atenção sempre presentes. Pela maneira franca como

sempre nos comunicamos e por se dispor a me receber sempre que solicitada, facilitando, mesmo à distância, a redação deste trabalho.

À Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo pelo incentivo, apoio, orientação e demonstração de profissionalismo e carinho pelo que faz, se dispondo a me atender mesmo em momentos difíceis. Agradeço muito pela receptividade e carinho sempre a mim conferidos; pela colaboração neste trabalho, sem o qual eu não o teria concluído.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro, pela coragem, força, amizade e incentivo sempre presentes em todos os momentos. Agradeço por ter me iniciado nesta carreira acadêmica; sempre me apoiando e confiando no meu potencial, guardo comigo este carinho e tenho o seu exemplo de educadora e mestra na construção da minha vida acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita pela colaboração na utilização da técnica AgNOR e pela paciência em me auxiliar em todos os momentos em que foi solicitado (e foram vários...).

Agradeço a aluna de Pós-Doutorado do Departamento de Patologia Bucal Profa. Dra. Adriana Etges, que com boa vontade e atenção realizou as fotos de AgNOR demonstradas neste trabalho.

Agradeço à todas as pessoas de bom coração que passaram pela minha vida durante a realização deste doutorado, que de maneira atenciosa me ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Acredito que ninguém faz nada sozinho e sempre teve alguém que ajudou, orientou sem nenhum interesse sobre isso. Agradeço à Deus por colocar pessoas no meu Caminho, onde tornou possível a realização deste doutorado.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”

Rubem Alves

SUMÁRIO

p.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Carcinogênese química	5
2.2 Peróxidos	18
2.3 Proliferação Celular e as Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs).....	34
3 PROPOSIÇÃO.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Material.....	43
4.2 Técnica Histoquímica AgNOR.....	45
4.3 Contagem das NORs.....	46
4.4 Representação dos resultados obtidos em estudo prévio.....	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Análise Quantitativa das NORs.....	49
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Distribuição gráfica dos aspectos morfológicos decorrentes da carcinogênese induzida, no período de 20 semanas47

Figura 4.2 – Aspectos macroscópicos e microscópicos dos carcinomas epidermóides desenvolvidos no modelo DMBA-indução.

H. E. (Aumento 40X e 1000X).....48

Figura 5.1 – Aspectos microscópicos das lâminas utilizando a técnica histoquímica AgNOR. **(A e B)** - Aspectos microscópicos do tecido epitelial nos **grupos II e III** (peróxido de carbamida 10%) utilizando a técnica histoquímica AgNOR. **(A)** Observa-se NORs nas células epiteliais com formas regulares, grandes e arredondadas com frequência de 1 a 3 NORs/núcleo (seta). (400X) **(C)** Aspecto microscópico do carcinoma invasivo epidermóide, DMBA-induzido, desenvolvido no **grupo IV** (DMBA) (25X) **(D)** observamos NORs nos núcleos celulares: pequenas, irregulares e com frequência de 3 a 5 NORs/núcleo (seta). (AgNOR – 400X). Aspectos microscópicos das NORs no carcinoma epidermóide invasivo desenvolvido no modelo DMBA-indução nos **grupos V e VI** (peróxido de carbamida 10% + DMBA). **(E)** Observar presença de pérolas córneas, pleomorfismo celular com atipia severa. **(F)** Presença de núcleos celulares com NORs pequenas, irregulares e em maior número com frequência de 5 a 7 NORs/núcleo em cada célula (seta), compatível com a severa atipia celular desenvolvidas nestes grupos. **(G e H)** Observar NORs nas células tumorais pulverizadas e em maior número(seta) (AgNOR-400X).....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Distribuição dos aspectos morfológicos decorrentes da carcinogênese induzida, no período de 20 semanas, no modelo DMBA-indução utilizando peróxido de carbamida 10%.....	47
Tabela 5.1 Número de NORs por lâmina em cada grupo.....	50
Tabela 5.2 Análise de Variância para comparação entre os grupos.....	50
Tabela 5.3 Ocorrência de NORs/núcleo.....	51
Tabela 5.4 Frequência de Ocorrências acima de 5 NORs/núcleo.....	52
Tabela 5.5 Frequências comparadas nos grupos II, III, IV, V, VI, VII.....	53
Tabela 5.6 Frequências comparadas envolvendo os grupos IV, V, VI e VII.....	53
Tabela 5.7 Frequências comparadas envolvendo os grupos IV, V e VI	54
Tabela 5.8 Frequências comparadas envolvendo os grupos V e VI.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Do inglês “Argyrophilic Nucleolar Organizer Region” nome dado à técnica de impregnação das NORs pela prata.
DNA	“Desoxyribonucleic acid”, traduzido com o ácido desoxirribonucléico
DMBA	Ácido dimetilbenzanthraceno
G1	Do inglês “Gap” traduzido como intervalo. G1 é o intervalo pós-mitótico e pré-síntese de DNA
G2	Do inglês “Gap” traduzido como intervalo. G2 é o intervalo pós síntese de DNA e pré-mitótico
H. E.	Hematoxilina e eosina
L.I.D.O.	Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia
NORS	“Nucleolar Organizer Regions” traduzido como regiões organizadoras nucleolares
PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen” traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular
RGB	“Red, Green, Blue” traduzido como vermelho, verde, azul
RNAr	“Ribossomal Ribonucleic Acid” traduzido como ácido ribonucléico ribossômico
RNA	“Ribonucleic Acid” traduzido como ácido ribonucléico
S	Fase do ciclo celular
TNM	Sistema de estadiamento clínico, sendo T= tumor primário, N= linfonodos regionais, M= metástase

RESUMO

ANÁLISE QUANTITATIVA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (NORS) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DESENVOLVIDOS EM HAMSTERS A PARTIR DO MODELO DMBA- INDUÇÃO COM AGENTES CLAREADORES DENTAIS

A grande prevalência de câncer bucal está relacionada à ação de agentes e de fatores físicos e químicos. As substâncias químicas têm grande importância na indução de cânceres em humanos. Existe grande preocupação em relação aos agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10%, usados com frequência na técnica de clareamento caseiro de dentes vitalizados. A preocupação deve-se ao potencial carcinogênico dessas substâncias. Com o efeito somatório sobre as células, toda e qualquer substância deve ser avaliada quanto ao seu potencial carcinogênico sobre a mucosa bucal. Com a intenção de avaliar a proliferação celular nos carcinomas epidermóides desenvolvidos no modelo DMBA-indução associado ao peróxido de carbamida 10%, utilizou-se um dos marcadores biológicos de proliferação celular, que é o método histoquímico pela técnica AgNOR. Foram avaliados quantitativamente os carcinomas epidermóides desenvolvidos no modelo DMBA-indução + peróxido de carbamida 10%, observando-se que: nos grupos I, II, III e VII, onde não houve proliferação celular compatível com alteração neoplásica, o número de ocorrências de NORs/núcleo foi menor que nos demais grupos; no grupo IV (DMBA), o número de ocorrência de NORs/núcleo foi menor que nos grupos V e VI (peróxido de carbamida 10% + DMBA). O número de ocorrência de NORs/núcleo foi maior nos grupos V (DMBA + Opalescence) e VI (DMBA + White & Brite), em que foram desenvolvidos carcinomas, caracterizando maior proliferação das células e maior grau de malignidade dos carcinomas epidermóides desenvolvidos. Tais conclusões evidenciaram que a proliferação celular nos grupos associados (clareadores + DMBA) foi

mais intensa que no grupo do carcinógeno (DMBA), possivelmente pelo efeito promotor dos agentes clareadores. Observou-se uma ação promotora dos clareadores dentais à base de peróxido de carbamida 10% no modelo estudado, com capacidade para potencializar carcinógenos, levando a um possível desenvolvimento neoplásico.

1 INTRODUÇÃO

A grande prevalência de câncer bucal está relacionada à ação de agentes físicos e químicos. No mundo moderno, com a industrialização, as substâncias químicas passaram a exercer grande importância na indução de cânceres em humanos (Shklar, 1968; Saltz, 1988; Mendonça, 1992).

As substâncias químicas, potencialmente carcinogênicas, parecem ser a causa mais importante e conhecida de câncer, pois as freqüentes exposições a elas, em consequência dos hábitos alimentares, sociais (como bebidas alcoólicas e cigarros) e poluentes ambientais passaram a exercer, ao longo do tempo, influência sobre o desenvolvimento dessa doença (Miller, 1978; Higginson, 1993).

Os agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10% são utilizados com freqüência na técnica de clareamento caseiro de dentes vitalizados. Nesta técnica, o próprio paciente faz a aplicação do agente clareador em casa, utilizando uma moldeira de acetato confeccionada em consultório. O paciente é orientado quanto à forma correta de utilizar o produto, e o tratamento é supervisionado pelo profissional. Existe grande preocupação em relação ao uso dessas substâncias sem nenhuma proteção dos tecidos moles e, também, quanto à sua ingestão durante o tratamento, expondo o paciente ao contato direto com a substância. A preocupação está

relacionada ao potencial carcinogênico dessas substâncias (Pieroli *et al.*, 2000).

Nos trabalhos de Hirota & Yokoyama (1981); Ito & Watanabe, (1981) e Weitzmann *et al.* (1986), que analisaram o potencial carcinogênico do peróxido de hidrogênio, um componente ativo do peróxido de carbamida a 10%, os autores constataram o seu efeito carcinogênico no desenvolvimento de carcinomas em modelos experimentais em roedores.

Diante destes trabalhos, com a intenção de avaliar o potencial carcinogênico dos agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10%, Pieroli *et al.* (2000) realizaram um estudo a partir do modelo experimental de DMBA-indução para carcinogênese química, tendo concluído que os clareadores à base de peróxido de carbamida a 10% potencializaram o efeito do carcinógeno (no caso, o DMBA), atuando provavelmente na fase de promoção tumoral apresentando, portanto, um potencial co-carcinogênico.

A partir dessas verificações, pôde-se concluir que o uso de agentes clareadores sobre a mucosa bucal representa mais um dos fatores que podem potencializar a ação dos vários carcinógenos com os quais diariamente entramos em contato por intermédio dos alimentos, dos medicamentos e do próprio meio ambiente, como os gases industriais. Devido ao efeito somatório sobre as células, toda e qualquer substância química que possa entrar em contato com a mucosa bucal deve ser avaliada quanto ao seu potencial carcinogênico. Neste aspecto, a boca, constitui o

local mais submetido à ação carcinogênica do organismo humano (Pieroli *et al.*, 1997; Pieroli, 2000).

O carcinoma epidermóide é a neoplasia mais freqüente da cavidade bucal, sendo também chamado de *carcinoma espinocelular* ou de *células escamosas*. Este carcinoma apresenta um comportamento agressivo, com alta capacidade de proliferação, de invasividade e com capacidade para gerar metástase (Neville *et al.*, 1998).

Os métodos mais utilizados para a avaliação do prognóstico neste tipo de lesão são o estadiamento clínico TNM (Tumor, Nódulo e Metástase) e a graduação histológica de malignidade (Aneroth *et al.*, 1987; Silverman, 1988). Porém, existem métodos que podem ser utilizados para detectar e quantificar as células em proliferação, como um parâmetro importante para o prognóstico.

A proliferação celular é considerada um importante indicador do comportamento biológico em vários tumores malignos e um direcionador para a terapia do câncer (Brown & Gatter, 1990). É definida como o aumento do número de células resultantes da complementação do ciclo celular (Rabenhorst *et al.*, 1993). Na vida de uma célula existem três caminhos a serem seguidos: as células proliferam; permanecem vivas, sem divisão; ou morrem por apoptose. A fração de crescimento de um tumor é determinado pelo número de células que estão proliferando, sendo a capacidade proliferativa aumentada uma das principais características das células tumorais (Rabenhorst *et al.*, 1993; Hofstädter *et al.*, 1995).

Para avaliar com mais profundidade a atividade proliferativa das neoplasias, marcadores biológicos têm sido propostos para quantificar a proliferação celular. Nos estudos do carcinoma epidermóide de boca podemos utilizar métodos histoquímicos na identificação das células no ciclo celular.

Um dos marcadores biológicos de proliferação celular é o método histoquímico pela técnica do AgNOR, o qual traz novas perspectivas para a compreensão do crescimento tumoral, com conseqüentes repercussões para o prognóstico e a terapêutica dessas lesões (Neville *et al.*,1998). Com o objetivo de avaliar mais profundamente a proliferação celular dos carcinomas epidermóides desenvolvidos quimicamente no modelo DMBA-indução + peróxido de carbamida 10%, foi utilizado o método histoquímico com a técnica AgNOR para esta avaliação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinogênese química e o Modelo DMBA - indução

A carcinogênese química bucal induzida é utilizada há muito tempo na investigação de diversas substâncias químicas quanto aos seus possíveis efeitos carcinogênicos ou co-carcinogênicos. A literatura relata os efeitos carcinogênicos de substâncias existentes em nosso meio ambiente, com as quais estamos em contato diário, tais como: o álcool, o fumo, os aditivos alimentares, os gases industriais e também as radiações solares (Miller, 1978; Barreto Neto, 1992; Higginson, 1993).

Atualmente, a crescente utilização de forma indiscriminada das substâncias clareadoras de dentes tornou-se uma preocupação. Levando-se em consideração a etiologia multifatorial do câncer e os escassos trabalhos na literatura testando o possível efeito carcinogênico dos clareadores, tornou-se necessário estudá-los mais profundamente. Serão abordados neste capítulo alguns aspectos relacionados ao desenvolvimento da carcinogênese bucal quimicamente induzida e ao desenvolvimento de neoplasias provocadas pelo contato de substâncias carcinógenas existentes no meio ambiente e das quais faz-se o uso direta ou indiretamente.

A carcinogênese é um processo dinâmico caracterizado por múltiplas etapas, definidas como: *iniciação, promoção, progressão e manifestação* (Beremblum, 1941; Fujita *et al.*, 1973a; Marefat & Shklar, 1977; Guimarães, 1982; Odukoya & Shklar, 1984; Marefat, 1985; Rubin & Farber, 1990; Higginson, 1993). A iniciação corresponde ao primeiro passo para o desenvolvimento neoplásico, sendo irreversível, porque lesa de forma permanente a estrutura do DNA. Uma vez a célula estando iniciada, ela passa por um período de latência, que corresponde ao intervalo entre a exposição ao carcinógeno e o aparecimento de lesões neoplásicas visíveis. As células iniciadas, em contato com agentes promotores, passam a expressar suas alterações, antes latentes. É a etapa de promoção da carcinogênese, em que os promotores estimulam a proliferação celular e modulam sua diferenciação, com o aparecimento de uma nova população celular, com propriedades diferentes da célula inicial, gerando a neoplasia. Os agentes promotores, chamados de *co-carcinógenos*, aumentam a atividade oncogénica dos carcinógenos e aceleram a transformação neoplásica das células. A etapa seguinte é a progressão, em que ocorre a evolução da neoplasia maligna. Segue-se a etapa da manifestação clínica do câncer (Guimarães, 1982; Robbins *et al.*, 1989; Rubin & Faber, 1990; Rodrigues & Camargo, 1992).

A seguir, serão enfocados alguns trabalhos relacionados ao estudo da carcinogênese química bucal.

A carcinogênese química bucal teve início com as investigações de Salley (1954), que demonstrou que os carcinomas espinocelulares poderiam ser produzidos em mucosa bucal de bolsa de bochecha de hamsters, por meio de múltiplas aplicações locais de agentes carcinogênicos químicos, como o DMBA. Os objetivos do autor consistiram em: avaliar a suscetibilidade do epitélio da bolsa da bochecha de hamster à ação de agentes carcinogênicos químicos, como o DMBA, o metilcolantreno e o benzopireno; e determinar o carcinógeno a ser utilizado em futuras investigações. Neste trabalho, o autor observou que a solução de DMBA diluída em acetona promoveu os melhores resultados, sendo que os demais apresentaram resultados positivos, porém em proporção menor. Os tumores desenvolvidos variaram de papilomas a carcinomas espinocelulares, com metástases para linfonodos regionais.

Shaw (1970), descreveu que muitos agentes químicos, físicos e biológicos podem causar mudanças (quebras) nos cromossomos humanos e mutação genética. Tais mudanças nos genes e cromossomos não produzem perigo imediato à saúde, porém as alterações podem ser indetectáveis por vários anos ou gerações. O autor relacionou vários componentes químicos e físicos existentes em nosso meio que podem causar mudanças nas células. Por exemplo: os aditivos alimentares e os conservantes: nitrato de sódio,

presente nos defumados, ciclamato (adoçante), glutamato monossódio (espessante), benzopireno - hidrocarbonetos aromáticos (combustão do tabaco), aflatoxina B1 (toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, devido à má conservação de grãos, como o amendoim).

Foi realizado por Fujita *et al.* (1973a), um dos primeiros trabalhos em língua de hamster. Eles conseguiram criar uma metodologia mais eficiente para produzir maior incidência de carcinoma lingual em um tempo menor. Eles dividiram 82 animais em 6 grupos. O grupo 1 recebeu aplicações de DMBA a 0,5%, em acetona, três vezes por semana, no terço médio da borda lateral da língua, precedidas por escarificação; o grupo 2 teve o mesmo procedimento. sem escarificação prévia; o grupo 3 recebeu aplicações de acetona, com escarificação prévia; o grupo 4 recebeu apenas acetona; o grupo 5 só escarificação; e o grupo 6 não foi tratado. Os animais foram observados até a sua morte. Como resultado, o autor observou: no grupo 1 notavam-se ulcerações com 24 horas, e todos os animais morreram em 27 semanas; o grupo 2 não apresentou ulceração, e com 20 semanas, 1 animal apresentou tumor, sendo que ao final de 27 semanas, 4 animais morreram e os demais continuaram a desenvolver tumor; os grupos restantes não desenvolveram tumor; a diferença entre os grupos 1 e 2 foi significativa, e neste caso o fator escarificação funcionou como porta de entrada do carcinógeno e o epitélio da área escarificada, por estar em regeneração tornou-se susceptível à ação do carcinógeno.

Ainda em 1973b Fujita *et al.*, com o objetivo de estabelecer uma metodologia experimental de carcinogênese química semelhante ao que ocorre no homem, avaliaram qual seria o local da língua mais susceptível a indução química tumoral e o seu grau de malignidade. Foram avaliadas cinco regiões linguais com a aplicação de DMBA utilizando hamsters e dividindo-os em cinco grupos. O grupo 1 recebeu aplicações na porção média da borda lateral da língua; o grupo 2, na porção anterior da borda lateral da língua; o grupo 3, na porção média do dorso lingual; o grupo 4, na ponta da língua; e o grupo 5, na porção ventral da língua. As aplicações foram feitas com DMBA a 0,5% em acetona, 3 vezes por semana, após escarificação local. Como mostram os resultados, o período de latência foi significativamente menor para o grupo 1, e as metástases regionais e a infiltração tecidual foram mais freqüentes neste grupo. Os grupos 2, 3, 4 e 5 foram intermediários, sendo que o grupo 3, necessitou de período experimental muito maior para o desenvolvimento tumoral.

Fridovich (1978), fez uma análise dos radicais superóxidos presentes no organismo, salientando a toxicidade dos radicais de oxigênio. Estes radicais podem interagir com o peróxido de hidrogênio ou com peróxidos orgânicos, ocorrendo processos altamente reativos, que podem atacar o DNA, as membranas lipídicas e outros componentes celulares essenciais. O autor discorreu ainda sobre os mecanismos de defesa biológicos naturais existentes para prevenir danos às células.

Miller (1978), no *68th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado*, abordou alguns aspectos relacionados à carcinogênese química em humanos. A apresentação focalizou as causas dos cânceres humanos, relacionando-os ao meio ambiente, à radiação solar e a produtos químicos que funcionam como carcinógenos naturais ou sintéticos. Epidemiologistas afirmam que 60% a 90% dos cânceres humanos têm fatores do meio ambiente na sua etiologia. A radiação solar constitui um importante fator causal de câncer de pele, e maior ênfase tem sido dada aos meios químicos. considerados como principal fator etiológico de câncer em humanos. A autora discorreu ainda sobre o desenvolvimento da carcinogênese desde o seu início, em que os primeiros estudos foram feitos mediante a observação de pessoas que trabalhavam com produtos químicos e que desenvolveram câncer. A partir de 1940, os carcinógenos químicos passaram a ser conhecidos e estudados. A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, começando pela iniciação tumoral, que pode ser efetuada por uma simples dose de um carcinógeno, como um agente alquilante, hidrocarbono aromático. A fase de iniciação tem como característica completar-se rapidamente e ser irreversível. A segunda etapa é a promoção, que ocorre em um período de semanas ou meses e requer repetidas doses de um promotor.

Isquierdo (1979), avaliando as diferenças entre o tratamento contínuo e o tratamento descontínuo com o DMBA, utilizou 160 hamsters sírios dourados, dividindo-os em 2 grupos e realizando o tratamento três vezes por semana na bolsa da bochecha de hamster. O grupo 1 recebeu tratamento contínuo com a droga por 8 semanas e o grupo 2 recebeu tratamento descontínuo (duas semanas de aplicação, uma de descanso, três de aplicação, uma de descanso e três de aplicação). Foi utilizado um grupo controle de 80 hamsters. A observação dos animais foi realizada até a sua morte, quando se realizaram as necropsias para verificar metástases. A partir da oitava semana de tratamento, os animais desenvolveram neoplasias em ambos os grupos. O grupo 1 passou por fases de inflamação, úlcera, reparo e tumor. O grupo 2, após inflamação, apresentou regeneração na semana de descanso e reparo. Cerca de 80% dos animais tratados apresentaram neoplasias em foco único, ou múltiplo, na área da aplicação. Ao final de 2 meses, a sobrevivência foi de 90%, diminuindo para 60% após 4 meses e 30% após 6 meses. Na necropsia houve o aparecimento de 50% dos casos de neoplasia abdominal (linfoma) e ausência de metástases. O autor concluiu que com a utilização dessa técnica existe uma grande simplificação na aplicação de carcinógenos, reduzindo tempo e trabalho.

Nelson (1981), em uma apresentação na *American Cancer Society National Conference on Cancer Prevention and Detection*, Chicago, 1980, fez uma análise sobre o crescimento de substâncias químicas industriais às

quais o ser humano se expõe diariamente no meio ambiente, seja trabalhando nas indústrias, no contato com os alimentos por meio dos aditivos, na poluição do ar, na radiação solar e, até mesmo, pela contaminação com poluentes orgânicos no tratamento da água, sendo que a maioria dessas substâncias são carcinogênicas ou co-carcinogênicas. Como conclusão, ele fez um alerta: a exposição ao meio ambiente e o contato com substâncias, principalmente, as químicas, favorecem o aumento da ocorrência de câncer nos seres humanos.

Em um trabalho de revisão de 1981, Miller & Miller realizaram uma ampla abordagem sobre os mecanismos da carcinogênese, suas causas possíveis. Eles discutem sobre os agentes etiológicos, principalmente os químicos, no desenvolvimento do câncer. Neste trabalho foram enfocados também os múltiplos estágios da carcinogênese e suas reações químicas para o desenvolvimento do câncer. Como prevenção, os autores sugerem uma exposição menor aos fatores químicos que existem em nosso meio já conhecidos como carcinogênicos.

Odukoya & Shklar (1982), com a finalidade de avaliar a existência de dois estágios na carcinogênese no modelo de DMBA-indução em hamsters, utilizaram 60 animais, dividindo-os em 3 grupos. No Grupo 1, aplicaram três vezes por semana, durante 10 semanas, solução oleosa de DMBA a 0,1 %, sendo controlados por mais 10 semanas; no Grupo 2, aplicaram a mesma

solução de DMBA por 10 semanas, interrompendo o procedimento por 6 semanas, quando então uma solução de DMBA a 0,5 % foi aplicada igualmente na bolsa de bochecha da 16^a a 20^a semana; no Grupo 3, os animais não foram tratados até a 16^a semana, quando eram iniciadas as aplicações de DMBA a 0,5 % em óleo mineral. Ao término da 20^a semana todos os animais foram sacrificados e os espécimes teciduais fixados em formalina, incluídos em parafina, cortados e corados em H.E. Os resultados encontrados demonstraram: o Grupo 1 apresentou-se normal, sem alterações teciduais; o grupo 3 apresentou áreas de hiperqueratose e displasia, além de regiões com inflamação crônica e algumas ulcerações e inflamação aguda purulenta, com evidências de carcinoma; e no Grupo 2 os animais apresentaram hiperqueratose, numerosas áreas de displasia e carcinoma *in situ*, além de ocasionais carcinomas epidermóides papilíferos, sendo que os carcinomas mostraram-se bem diferenciados, com formação marcante de queratina e uma mínima invasão do tecido conjuntivo subjacente. Esses achados demonstram a provável existência de uma fase de iniciação por um carcinógeno em baixa concentração. Nesta iniciação existe alguma alteração celular, mas não visível à microscopia de luz. Essa presumível alteração celular não desenvolveu neoplasias durante as 10 primeiras semanas subseqüentes à aplicação do DMBA a 0,1 %, mas uma segunda série de aplicação de DMBA a 0,5 % produziu carcinomas no grupo 2, provavelmente pelo papel promotor do mesmo, confirmando assim o conceito de que há duas fases na carcinogênese química.

Odukoya & Shklar (1984), estudaram as fases de iniciação e promoção da carcinogênese bucal em modelo experimental. Uma dose inicial de DMBA a 0,1% em óleo mineral aplicada na bolsa bucal de hamster três vezes por semana por 10 semanas, após 25 semanas, não resultou no desenvolvimento de carcinomas. Todavia, quando a dose inicial de DMBA era seguida de um período de seis semanas, sem tratamento, após o qual foi aplicado o peróxido de benzoil a 40%, por mais seis semanas, ocorreu um rápido desenvolvimento de carcinoma epidermóide. O peróxido de benzoil e seu solvente acetona não são carcinogênicos diretos. Assim, a solução de peróxido de benzoil a 40% em acetona agiu como promotor de DMBA na carcinogênese na bolsa bucal de hamster.

Cantoni *et al.* (1986), avaliaram a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio sobre o DNA. Utilizando meio de cultura de células de ovário de hamster, os autores verificaram a ocorrência de uma simples quebra nas cadeias do DNA, induzida pelo radical $\text{OH}^\cdot$, o que não representou necessariamente nenhuma lesão fatal à célula, devido aos seus eficientes e rápidos processos de reparo. Entretanto, quando ocorreu uma interferência neste mecanismos reparadores, neste caso representado por um inibidor enzimático (3-aminobenzidamida), observou-se a influência neste processo, decorrendo na fixação da lesão. Apesar dos resultados encontrados evidenciarem um efeito citotóxico do H_2O_2 sobre o DNA, outras formas de danos celulares também devem ser consideradas, como a peroxidação dos

lipídeos e a destruição das membranas de fosfolipídeos, que contribuem decisivamente para a morte celular.

Robbins *et al.* (1989), fizeram uma abrangente descrição das neoplasias, dos agentes carcinogênicos e de suas interações celulares. Foram descritas as etapas da carcinogênese química, bem como as substâncias químicas carcinógenas. Os autores definiram como agente co-carcinogênico aquele que tem a capacidade de induzir tumores em células iniciadas; porém, por si só não são tumorigênicos, pois, provavelmente, os promotores não afetam diretamente o DNA. As substâncias químicas possuem a capacidade tanto de iniciação quanto de promoção, evidenciadas por sua habilidade de induzir tumores sem o acréscimo de quaisquer outros fatores; são os carcinógenos completos. As células iniciadas são suscetíveis à ação dos promotores e dão origem a tumores, quando devidamente estimuladas pelos agentes promotores.

Higginson (1993), comenta alguns aspectos da ação dos carcinógenos químicos na população humana. A *International Agency for Research on Cancer* considerou como carcinogênicos químicos para o homem produtos como: o fumo, o álcool, a dieta, os aditivos alimentares, a poluição e os produtos industriais. Cerca de 80% dos cânceres humanos são de origem ambiental, sendo suas causas atribuídas aos mais variados fatores do meio ambiente. Segundo o autor, evidências sugerem que de 25%

a 50% dos cânceres no Ocidente são influenciados por constituintes naturais da dieta e por constituintes químicos que são produtos celulares normais ou metabólitos.

Rodrigues & Camargo (1992), descreveram a carcinogênese química e suas múltiplas etapas. Afirmaram que estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstram que fatores variados da natureza, tais como agentes químicos, físicos e biológicos, são capazes de induzir a transformação neoplásica. Os autores acreditam que em condições naturais a transformação neoplásica resulta da confluência de múltiplos fatores.

Rubin & Farber (1990), fizeram uma descrição sobre a carcinogênese química, definindo-a como um processo de múltiplas etapas, que podem ser divididas em: iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica da lesão. Descreveram, entre outros, os fatores que influenciam a carcinogênese química: hormônios, dieta, químicos promotores ou iniciadores.

Camargo *et al.* (1994), apresentaram um trabalho sobre os testes para detecção de cancerígenos químicos e destacaram as vantagens de se adotar testes de curta duração para avaliar as substâncias químicas existentes em nosso meio. Os autores comentaram que no Brasil não há condições para se fazer os testes existentes, que são de longa duração, pois faltam infra-

estrutura e pessoal especializado. Como o aumento de substâncias químicas de origem industrial passou a representar de 1 a 8% das neoplasias humanas, tornou-se necessário que o governo de cada país regulamentasse a sua produção, uso, distribuição e eliminação destes agentes químicos, potencialmente cancerígenos, em benefício da população. Para isso existem dois tipos de estudo: os clínicos - epidemiológicos e os experimentais em roedores. Quando um agente cancerígeno é detectado pelos estudos epidemiológicos significa que a população já se comprometera com o efeito nocivo da substância. Desta forma, os testes experimentais em roedores são os mais apropriados. Esses animais devem ser submetidos a tais agentes químicos antes que possa haver qualquer contato com humanos. Apenas os testes de mutagenicidade não são suficientes para comprovar a carcinogenicidade das substâncias, pois cerca de 25%-30% delas não têm potencial mutagênico (alterar o DNA diretamente) e não são detectáveis pelos testes de mutagenicidade. No entanto, são potentes carcinógenos, que atuam nas células indiretamente pela proliferação celular. São denominados *agentes não-genotóxicos*. Os autores enfocaram ainda a dificuldade de se fazer os testes de longa duração no Brasil devido ao alto custo e pelo fato de muitas substâncias estarem à espera de análise.

2.2 Peróxidos

O peróxido de carbamida pode ser encontrado em concentrações de 10%, 11%, 15%, 16%, 22%, 35% e 37% em anidro glicerol ou glicerina ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}_2$) (Dishman & Baughan, 1992; Fasanaro, 1992). Esta substância também é conhecida como peróxido de uréia, peróxido de hidrogênio uréia, peróxido de hidrogênio carbamida ou peridrol-uréia. É utilizado na técnica caseira de clareamento dos dentes vitalizados (Haywood & Heymann, 1989; Darnell & Moore, 1990; Fasanaro, 1992; Strassler *et al.*, 1992; Tam (1999, 2001). É uma substância instável, e quando em contato com a saliva se dissocia em 3,6% - 5% de peróxido de hidrogênio e 6,4% - 7% em uréia (Haywood & Heymann, 1989; Fasanaro, 1992; Pieroli, 1996; Haywood, 1997). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, dissocia-se em oxigênio e água, quebrando-se posteriormente e liberando os radicais livres. A uréia dissocia-se em amônia e dióxido de carbono (Haywood & Heymann, 1989; Adept Report, 1991; Fasanaro, 1992; Hays *et al.*, 1995; Fiedler & Reicht, 2000; Frazier & Haywood, 2000).

O peróxido de hidrogênio é o ingrediente ativo do peróxido de carbamida. A presença destes radicais livres, originários da quebra do peróxido de hidrogênio, é preocupante pelo fato dos radicais O_2 (ânions superóxidos) e OH^- (íons hidroxila) serem radicais oxidantes altamente reativos e tóxicos que agem diretamente nos componentes vitais das células,

onde danificam membranas celulares, alteram o DNA e as proteínas, podendo causar mutações (Imlay & Linn, 1988; Powell & Balles, 1991; Cherry *et al.*, 1993). Sabe-se que o organismo possui mecanismos de defesa bioquímicos e reparos intracelulares que reagem com os radicais livres para inativá-los, como é o caso do sistema enzimático (Fridovich, 1978). Entretanto, este mecanismo pode sofrer interferências no processo de reparo, causando alterações e, possivelmente, permitindo a fixação da lesão na célula (Cantoni *et al.*, 1986; Imlay & Linn, 1988). Em relação ao pH desses clareadores, sabe-se que fica em torno de 4,6 a 7,4 (Darnell & Moore, 1990; Adept Report, 1991; Bartlett & Walmsley, 1992; Dishman & Baughman, 1992; Fasanaro, 1992; Haywood, 1992; Hawood, 1997; Price *et al.*, 2000). O peróxido de carbamida divide-se em duas categorias quanto à presença ou ausência de carbopol, um polímero de carboxipolimetileno ou uma base de glicerol, Carbomer 940. O carbopol é um polímero solúvel em água com alto peso molecular e funciona como um espessante utilizado para estabilizar o processo de dissociação do clareador, além de liberar o oxigênio nascente de maneira mais lenta e aumentar a aderência do produto à estrutura dentária, pela sua viscosidade (Haywood & Heymann, 1989; Adept Report, 1991; Bailey & Swift Jr., 1992; Dishman & Baughman, 1992; Hays *et al.*, 1995; Pieroli & Navarro, 1996; Haywood 1997; Tam (1999, 2001).

A seguir, serão enfocados alguns trabalhos sobre a citotoxicidade, efeitos mutagênicos dos peróxidos e também quanto à regulamentação destes produtos como clareadores caseiros.

Giusti (1973), relatou um caso de ingestão fatal de peróxido de hidrogênio a 30%-35% por uma criança de um ano de idade. A criança morreu uma hora após a ingestão por falha respiratória e apresentando distensão do abdômen. O exame histológico demonstrou na mucosa do estômago, duodeno e esôfago evidências de necrose. O autor salientou que a ingestão do peróxido nas concentrações de 3% a 9% pode causar irritação na membrana da mucosa gástrica e uma média distensão abdominal.

Ito & Watanabe (1981), avaliaram a indução de tumores duodenais em ratos pela administração de peróxido de hidrogênio. Os animais foram divididos em 3 grupos de 100, adicionando-se solução de peróxido de hidrogênio na água destilada para beber, com diluição de 0,4%, 0,1 % e 0%. No início do estudo, os animais tinham 8 semanas de idade, e o experimento foi até os animais completarem 108 semanas de idade. Obtiveram os seguintes resultados: os grupos de 0,4% e 0,1% de diluição apresentaram alta incidência de hiperplasia 62% e 40%, respectivamente; foi encontrado adenoma duodenal em 5% no grupo de 0,4% de diluição e 1% no grupo de 0,1% de diluição e erosões gástricas apareceram em 40 semanas, hiperplasia duodenal em 10 semanas e carcinomas duodenais em 65 semanas. Os autores concluíram que o peróxido de hidrogênio pode ter dupla função na formação de nódulos duodenais, ampliação de ocorrência espontânea de hiperplasia duodenal e transformação de nódulos hiperplásicos em neoplásicos.

Hirota & Yokoyama (1981), observaram o efeito potencializador do peróxido de hidrogênio na carcinogênese duodenal em ratos, na parte alta do jejuno. Os animais foram divididos em quatro grupos. Os grupos I e II receberam injeção de acetato (methylazoxymethanol - MAN), um potente carcinógeno, intraperitoneal, começando com a idade de 12 semanas com uma dose de 25 mg/Kg, 3 vezes, uma vez a cada 2 semanas. A água com o peróxido foi administrada durante todo o tempo da injeção, exceto 2 dias de intervalo, seguindo a cada injeção, quando foi dada a água de torneira. No grupo I a água com peróxido foi dada continuamente durante o experimento; no Grupo II foi descontinuada e os animais foram mudados para água de torneira; no Grupo III recebeu água com peróxido durante todo o experimento; e o Grupo IV foi tratado como controle. Os animais foram sacrificados com 29 semanas, dando-se particular atenção às alterações intestinais. Obtiveram-se os seguintes resultados: ocorreram tumores na parte superior do jejuno, e no duodeno com incidência maior no Grupo I do que no Grupo II; histologicamente, todos os tumores foram diagnosticados como adenocarcinomas (mucoso ou invasivo); no Grupo I 100% dos animais apresentaram adenocarcinomas, contra apenas 25% no Grupo II. A carcinogênese, tanto no duodeno como no jejuno, foi mais pronunciada no Grupo I; nenhuma alteração neoplásica foi encontrada nos Grupos III e IV, mas no grupo III apareceu hiperplasia epitelial, tanto no duodeno como no jejuno; e uma incidência maior de carcinoma duodenal foi encontrada em animais que foram tratados continuamente com peróxido de hidrogênio por

13 semanas até o término, seguindo a administração do MAN, em comparação com os animais que não receberam por longo tempo o peróxido, na água, depois deste tratamento. Os dados deste trabalho sugeriram que a administração prolongada de peróxido de hidrogênio aumentou os efeitos carcinogênicos nos ratos tratados com o carcinógeno MAN.

Freemann & Crapo (1982), realizaram um trabalho de revisão em que analisaram os efeitos dos radicais livres nas células, o seu mecanismo de ação e os sistemas de defesa das células. Os autores salientaram que vários agentes ambientais, incluindo poluentes do ar, o fumo, os pesticidas, os solventes e os hidrocarbonetos aromáticos em geral, liberam radicais livres prejudiciais às células. A presença dos radicais livres nas células é regulada por mecanismos enzimáticos normais de defesa. Tais mecanismos atuam para diminuir a quantidade destes radicais presentes nas células, pois em excesso causam danos aos componentes celulares.

Weitzman *et al.* (1984), discutiram a possibilidade dos metabólitos do peróxido de hidrogênio danificarem o DNA das células e causarem mutações. Os autores alertaram para a administração crônica do peróxido de hidrogênio no tratamento de doenças gengivais, pois a exposição constante pode levar a alterações indesejáveis nos tecidos. As células são danificadas quando expostas a altas concentrações de oxidantes. A preocupação é que os peróxidos podem aumentar a expressão de tumores por outros

carcinógenos do meio ambiente. O tumor pode demorar anos ou décadas para se manifestar nos humanos. Há estudos que sugerem que os metabólitos de oxigênio podem produzir câncer em animais e homens. Como conclusão, os autores sugeriram que estudos devam ser realizados antes da população fazer uso desta substância.

Em 1986, Weitzman *et al.*, desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar o efeito carcinogênico do peróxido de hidrogênio no modelo de carcinogênese química bucal induzida em hamster. Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo que o grupo I recebeu DMBA; o grupo II, recebeu DMBA e peróxido de hidrogênio 3%; o grupo III, recebeu DMBA e peróxido de hidrogênio a 30%; e o grupo IV, recebeu peróxido de hidrogênio a 30%. A concentração do DMBA foi de 0,25% em óleo mineral. As bolsas da bochecha de cada hamster foram pinceladas 2 vezes por semana, e o sacrifício foi com 19 e 22 semanas. O resultado foi o aparecimento de hiperqueratose e hiperplasia em mais de 85% dos animais de todos os grupos com 19 semanas. Após 22 semanas, os animais do grupo I apresentaram carcinomas epidermóides em 3 dos 7 animais; no grupo II, 6 dos 11 animais desenvolveram carcinomas em 22 semanas; todos os animais do grupo III desenvolveram carcinomas invasivos; no grupo IV, os animais não desenvolveram carcinomas, porém apresentaram mudanças associadas com lesões pré-neoplásicas, incluindo hiperchromatismo de células e displasia média. Os dados sugeriram que ocorreu uma ação co-

carcinogênica do peróxido de hidrogênio no modelo analisado e que, sozinho ou associado, provocou mudanças pré-neoplásicas e aumentou a atividade mitótica e hiperplásica.

Rees & Orth (1986), avaliaram a utilização do peróxido de hidrogênio a 3% como anti-séptico bucal. Os autores observaram dois casos em que os pacientes fizeram uso da substância diariamente e apresentaram inflamação crônica nos tecidos, lesões na papila, dor ao toque, múltiplas ulcerações na mucosa alveolar e gengiva marginal. A preocupação dos autores está relacionada ao fato das altas concentrações de oxidantes, poderem danificar as células e o uso crônico de peróxido de hidrogênio poder lesar os tecidos periodontais, além do peróxido funcionar como carcinogênico ou co-carcinogênico se utilizado diariamente por longos períodos. Os autores sugeriram uma reavaliação da utilização desta substância no tratamento periodontal.

Berry (1990), questionou o uso dos clareadores de forma caseira quanto a sua segurança e ressaltou que os cientistas da ADA afirmam que os efeitos nos tecidos a longo prazo são desconhecidos. O peróxido de hidrogênio, liberado na dissociação do peróxido de carbamida quando em contato com a saliva, por sua vez, dissocia-se nos radicais livres de O_2 , que são ativos e possuem potencial para causar mudanças celulares. O Conselho Terapêutico da ADA reconheceu que o produto necessita de uma

avaliação mais ampla para que sejam conhecidos seus efeitos a longo prazo nos tecidos pelas repetidas aplicações do produto. O autor salientou que os cientistas da ADA não estão inteiramente convencidos da utilização dos agentes clareadores caseiros, pois o risco quanto a seu uso existe até que se conheça totalmente o seu potencial de ação.

Ainda com relação à ingestão dos agentes clareadores durante o clareamento caseiro, Simonsen (1990), alertou que o paciente ingere quantidade razoável da substância e que há carência de dados biológicos comprovando a ação tóxica da substância. Ele questionou nesse trabalho os riscos da utilização dessa técnica e sugeriu aos fabricantes que avaliassem biologicamente o produto quanto à segurança para não comprometerem o profissional e não exporem os pacientes a um risco desnecessário. Por fim, fez uma análise de como os clareadores foram amplamente divulgados sem que se conhecessem todos os seus efeitos e ressaltou que o paciente recebe um tratamento sem saber dos riscos.

Larson (1990), fez uma análise dos efeitos dos peróxidos sobre os dentes e tecidos gengivais, e reafirmando a preocupação quanto ao uso de produtos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, e de carbamida na cavidade bucal. Afirmou ainda que existem evidências de carcinogenicidade em várias concentrações de peróxido de hidrogênio nos tecidos bucais e em outros órgãos do corpo humano (estômago, duodeno, pele) e que a presença

de radicais livres como seu subproduto aumenta as possibilidades de malignidade. O autor enfatizou que o peróxido de hidrogênio é potencialmente prejudicial ao organismo humano, razão por que não recomenda o uso prolongado na cavidade bucal, pelos efeitos tóxicos que ocorrem nos tecidos moles.

Anderson (1991), discutindo as várias técnicas e os mecanismos de ação dos clareadores de dentes vitais, demonstrou sua preocupação em relação aos peróxidos utilizados na técnica caseira. Segundo o autor, a segurança destes produtos deve ser mais investigada, principalmente em relação aos possíveis efeitos dos radicais livres de oxigênio liberados nos procedimentos clareadores. As propriedades mutagênicas do material devem ser tratadas com cautela.

Christensen (1991), em um trabalho de divulgação, comentou a aceitação dos clareadores caseiros e afirmou que o seu uso de forma imprópria pode danificar tecidos dentais e tecidos moles. O autor salientou que o uso abusivo da técnica de clareamento caseiro ocorre pelo tempo de uso excessivo da moldeira, quantidade do material aplicado acima do necessário, excessos que o profissional não têm como acompanhar diariamente. Ressaltou ainda que nenhum clareador recebeu o selo de aceitação pela ADA e que mais pesquisas devem ser feitas para se conhecer

suas reações a longo prazo, pois, sendo uma técnica recente, não se conhece totalmente o seu potencial.

Powell & Bales (1991), avaliando os efeitos dos clareadores nos tecidos, constatou inflamação no tecido gengival, provavelmente devido à ação do peróxido de hidrogênio sobre o sistema vascular, aumento da permeabilidade dos capilares. O peróxido de hidrogênio danifica a membrana externa das células e afeta os seus componentes internos, além de alterar os fibroblastos humanos. Em condições normais, as células possuem um mecanismo de defesa (enzimas) e podem inativar o peróxido de hidrogênio, Entretanto, estes mecanismos podem falhar se os danos forem grandes. Os autores sugeriram cautela com o uso dos clareadores caseiros, até que mais pesquisas sejam realizadas.

Dishman & Baughan (1992), fizeram um trabalho de revisão sobre os clareadores caseiros, os materiais e as técnicas envolvidas, e salientaram alguns aspectos importantes sobre a posição da ADA e do FDA com relação a estes materiais. Enfatizaram que a partir de uma reavaliação do FDA esses produtos passaram a ser considerados como drogas, e não mais como cosméticos. O Conselho Terapêutico da ADA admite que os produtos devem ser melhor avaliados.

Gage *et al.* (1992), avaliaram a resposta dos clareadores nos tecidos quando aplicados topicamente. Foram utilizados: peróxido de hidrogênio a 3%, peróxido de carbamida a 10%, glicerina e solução salina como controle. O peróxido de carbamida e o peróxido de hidrogênio desenvolveram severas lesões bucais no epitélio, edemas e petéquias, congestão vascular, infiltrado neutrofílico, ulcerações e coagulação epitelial. O peróxido de hidrogênio apresentou-se um pouco mais nocivo topicamente do que o peróxido de carbamida. A glicerina apenas produziu sinais histológicos de inflamação média.

Strassler *et al.* (1992), discutiram a segurança, as indicações e as contra-indicações dos agentes clareadores. Entre outros pontos, comentaram sobre a preocupação da ADA e do FDA e sobre o uso dos clareadores de forma caseira sem a existência de pesquisas conclusivas sobre sua segurança. Afirmaram que as pesquisas clínicas existentes comprovam os efeitos da substância quanto ao tratamento clareador, porém os efeitos nos tecidos ainda não são totalmente conhecidos.

Tam (1992), descreveu as técnicas de clareamento caseiro e as realizadas no consultório, ressaltando os riscos do uso indiscriminado da técnica caseira, pela possível ingestão da substância durante o tratamento e por seus efeitos nos tecidos e células, questionando a segurança do material. A autora descreveu, também, trabalhos com o peróxido de

hidrogênio, verificando seu potencial carcinogênico e o perigo de se utilizar esta técnica caseira, que oferece riscos, ao invés de se utilizar com segurança a técnica no consultório.

Com a finalidade de verificar a toxicidade da ingestão do peróxido de carbamida, Cherry *et al.* (1993), avaliaram 63 fêmeas de ratos submetidos a 3 agentes clareadores. Foram utilizados os clareadores: White & Brite (10%), Nu-Smile (15%) e Quick Start (35%). As substâncias foram injetadas diretamente no estômago dos animais: 9 animais receberam White & Brite, 9 animais receberam Nu-Smile e 22 animais receberam Quick Start. Como resultado, os autores observaram alterações clínicas em todos os grupos, tais como: respiração difícil, cabeça bamboleante, incontinência urinária, crescimento abdominal e fechamento dos olhos. Na necropsia, observaram-se aumento interno do estômago, inchaço e distensão com gás, sangue no interior do estômago e intestino diminuído em quase todos os animais de todos os grupos. Os autores discutiram a ingestão dos clareadores caseiros durante o tratamento. Eles admitiram a possibilidade de serem ingeridas quantidades desconhecidas dessas substâncias e que os metabólitos dos clareadores, que são os radicais de hidroxyl e ânions superóxidos, em contato com as células podem produzir alterações nas membranas, danificando o DNA e outros componentes intracelulares. Os dados deste trabalho sugeriram que a ingestão dos clareadores avaliados provou serem

altamente tóxicos e que novos trabalhos devem ser feitos para verificar as doses ingeridas pelos humanos.

Goldstein & Kiremidjian-Schumacher (1993), publicaram um trabalho relacionado ao uso dos clareadores caseiros e aos riscos aos quais os pacientes se expõem para obter benefícios questionáveis, já que os clareadores nem sempre oferecem bons resultados. Os autores enfatizaram os danos que podem ser causados pelo uso prolongado da substância. Relataram que o procedimento é cosmético, e não terapêutico, e que por isso as agências que regulamentam produtos médicos e dentais não fazem a avaliação desses produtos quanto ao contato com tecidos bucais. Eles citaram que o Conselho Terapêutico da ADA não concede o selo de aceitação desses produtos até que mais pesquisas sejam realizadas. Por outro lado, os produtos são encontrados facilmente no mercado sem que estudos conclusivos tenham esclarecido os efeitos dos clareadores nos tecidos. Os autores enfatizaram que a maior preocupação é o contato dos peróxidos por um tempo prolongado com os tecidos moles e alertaram que os profissionais não deveriam esperar surgir o problema para depois resolvê-lo. Ou seja, os pacientes estão utilizando esses clareadores sem dados definitivos quanto à segurança do seu uso. Finalizando, os autores comentaram a afirmação da ADA de que os clareadores são efetivos no tratamento clareador, mas questionam sobre o custo e as conseqüências desse procedimento.

Em um trabalho Wandera *et al.* (1994), esclareceram que os clareadores caseiros foram considerados cosméticos pela FDA até 1991. Após essa data, em virtude das suspeitas quanto à segurança do seu uso, foram reclassificados como drogas. Em 1992, foram colocados em reexame, e os fabricantes continuaram a comercializar os produtos como sendo cosméticos. O FDA classificou o peróxido de carbamida como seguro quando utilizado como anti-séptico bucal, mas não avaliou a substância quanto ao uso prolongado como clareador dental.

Em uma importante publicação do Conselho Terapêutico Dentário da American Dental Association (1994) publicou as diretrizes para a aceitação de produtos de higiene oral contendo peróxido de hidrogênio. Essas diretrizes estabelecem que os produtos contenham a descrição de todos os ingredientes ativos, com suas respectivas funções e outros detalhes de importância. O Conselho demonstrou particular preocupação sobre os efeitos, a longo prazo, dos peróxidos nos tecidos da mucosa e tecidos duros e sobre os efeitos potenciais genotóxicos da reação do oxigênio. Foram recomendados testes *in vitro* e *in vivo* para verificar o potencial genotóxico. Quando os resultados desses testes fossem positivos em ambos os sistemas, *in vitro* e *in vivo*, seriam recomendados testes para verificar o potencial carcinogênico das substâncias no modelo utilizando hamsters. Essa publicação recomendou, ainda, o estabelecimento de protocolos de pesquisas clínicas para avaliar os agentes clareadores.

Pieroli (1997) realizou um trabalho em que verificou a carcinogenicidade do peróxido de carbamida 10% utilizado na técnica caseira de clareamento dental. Foram avaliados dois agentes clareadores utilizando o modelo DMBA - indução como metodologia para verificar o potencial carcinogênico dos clareadores. A amostra constou de 70 hamsters sírios dourados, divididos em 7 grupos de 10 animais cada um. As substâncias foram pinceladas 3 vezes por semana, durante 20 semanas, na porção média da borda lateral lingual dos animais. Os grupos foram divididos em: Grupo I (Acetona), Grupos II e III (peróxido de carbamida com e sem carbopol), Grupo IV (DMBA- ácido dimethylbenzantraceno), Grupo V (DMBA + peróxido de carbamida 10% com carbopol), Grupo VI (DMBA + peróxido de carbamida 10% sem carbopol) e Grupo VII (Água destilada).

Estes foram os resultados: nos Grupos I, II, III e VII observou-se que a mucosa não revelou alterações displásica e/ou neoplásicas; no Grupo IV, constatou-se displasia em 4 dos animais e carcinomas nos 6 restantes, sendo 3 microinvasivos e 3 invasivos; no Grupo V, todos os 9 animais desenvolveram carcinomas, sendo 2 microinvasivos e 7 invasivos; no Grupo VI, de 9 animais observados, 1 apresentou hiperplasia intensa e 8 carcinomas invasivos. Concluiu-se que os clareadores à base de peróxido de carbamida 10%, com ou sem carbopol, potencializaram o efeito do carcinógeno, no caso o DMBA, atuando provavelmente na fase de promoção tumoral. Os resultados sugerem que a técnica de clareamento dental deve ser executada pelo profissional, em seu consultório, com total proteção da

mucosa bucal, pelo isolamento absoluto, evitando-se a exposição do paciente a riscos desnecessários, preservando a sua saúde.

Tam (1999) publicou uma importante discussão sobre o uso dos clareadores questionando a segurança dos mesmos, especialmente quanto aos efeitos locais nos dentes e tecidos, à sensibilidade pós-operatória, às alterações morfológicas no esmalte, à irritação gengival e aos riscos de efeitos sistêmicos.

Leonard *et al.* (2001) relatam, por meio de microscopia eletrônica de varredura, alterações na superfície do esmalte com a utilização do peróxido de carbamida a 10% utilizados por 2 semanas na técnica de clareamento caseiro.

Cimilli & Pameijer (2001), avaliaram o efeito de peróxido de carbamida a 10%, 15% e 16% em relação a superfície do esmalte em dentes tratados de 5 a 10 dias, 6 horas por dia. Utilizando espectrofotometria observaram que os clareadores utilizados diminuíram significativamente a microdureza do esmalte e causaram a dissolução de cálcio do esmalte através da conversão da hidroxiapatita. Os autores relatam a preocupação quanto aos efeitos químicos desses clareadores na prática clínica.

2.3 Proliferação celular e as Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs)

A proliferação celular pode ser definida como um aumento do número de células resultantes da complementação do ciclo celular.

A célula em um organismo pode seguir três caminhos: ela pode proliferar, estar viva sem divisão ou morrer por apoptose. A fração de crescimento de um tumor é determinada pelo número de células que estão proliferando, sendo a capacidade proliferativa aumentada uma das principais características das células tumorais (Rabenhorst *et al.*, 1993; Hofstädter *et al.*, 1995).

Uma característica de proliferação das células neoplásicas é o crescimento desordenado. Estudos sobre os mecanismos que regulam o ciclo celular contribuem para a melhor compreensão da proliferação celular como um parâmetro do comportamento dos tumores (Rabenhorst *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1996).

O ciclo celular corresponde aos processos que ocorrem na célula, desde sua formação, até sua divisão em duas células filhas. As fases G1, S, G2 e M correspondem às fases consecutivas do ciclo celular. As fases G1, S, e G2 correspondem à interfase, que é um período de intensas atividades relacionadas com a proliferação celular, caracterizando-se por mudanças no conteúdo de DNA da célula e por alterações bioquímicas e fisiológicas. Um

conjunto de mecanismos bioquímicos regulam o ciclo celular e muitas dessas reações envolvem proteínas reguladoras atuando na síntese de DNA na fase S e o processo de mitose. (Rabenhorst *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1994; Hall & Coates, 1995).

A descoberta de proteínas que atuam na replicação do material genético permitiu que se investigassem vários métodos de avaliação da proliferação celular em material histológico. Em 1986, Ploton *et al.* descreveram uma técnica modificada para demonstração das NORs (Regiões Organizadoras Nucleolares) e aplicadas em secções histológicas. Esta técnica ficou conhecida como AgNOR, onde é possível visualizar NORs na microscopia de luz como pontos negros intranucleares.

Inúmeras proteínas estão localizadas adjacentes às NORs, desempenhando um papel na descondensação e/ou na transcrição do DNAr e na maturação do RNAr. A mais estudada recebeu o nome de Ag-NOR, por se tratar de uma proteína não histônica e argirofílica, onde sua origem bioquímica é ainda controvertida. Pela sua argirofilia, essa proteína é considerada como marcadora da atividade celular e do potencial de transcrição do DNA-ribossômico (Walker, 1988; Matolcsy *et al.*, 1992; Mesquita, 1996).

A técnica AgNOR consiste em coloração pela prata das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleares (NORs), que permitem identificar, através da análise quantitativa e morfométrica dessas regiões a atividade proliferativa celular. A prata utilizada é reduzida em micronúcleos de prata e são depositadas dentro dos núcleos celulares, onde se revela a posição ativa de transcrição da NOR dentro dos núcleos celulares, podendo ser utilizada para obter informação sobre a estrutura dos nucléolos e atividade nucleolar em condições hiperplásicas e neoplásicas (Hernandez-Verdun & Fakan, 1986; Walker 1988; Matolcsy *et al.*, 1992).

Alguns trabalhos correlacionam a análise quantitativa das NORs com a atividade celular, considerando-a como um bom marcador da proliferação celular, sendo utilizada como auxílio de diagnóstico, fornecendo a distinção entre células benignas e malignas, e até mesmo para a avaliação do prognóstico de várias entidades patológicas (Derenzini *et al.*, 1990; Mesquita, 1996).

Crocker *et al.* (1989) discutiram os aspectos técnicos do AgNOR, como fixação e processamento, pois alguns estudos mostraram que alguns fixadores são contra-indicados para a reação do AgNOR, sendo o formol a 10% um fixador adequado. Segundo Crocker, existem três tipos de configurações para o AgNOR em células normais e neoplásicas: o primeiro é comum em linfócitos e em células que não estão proliferando, cujas NORs

são totalmente agregadas de forma arredondada correspondente ao nucléolo; o segundo é muito freqüente em células que estão proliferando, cujas NORs são vistas no interior do nucléolo. O terceiro tipo é muito freqüente em células malignas, onde observam-se pequenas e numerosas NORs dispersas por todo núcleo.

Em 1990, Derenzini *et al.*, encontraram correlação positiva entre a atividade de duplicação de DNA e a quantidade de NORs das células. Quanto mais rápido o crescimento celular, maior a quantidade de NORs.

Existem algumas explicações para esse maior número das NORs/núcleo nos tumores malignos, incluindo: **a)** a proliferação celular é tão ativa que a dissociação nucleolar está presente em muitas células e as NORs, estariam conseqüentemente, dispersas em toda a parte do núcleo; **b)** existe um defeito na associação nucleolar, resultando na dispersão das NORs; e **c)** em células aneuplóides pode haver um maior número de cromossomos, incluindo os que representam os locais das NORs (Rosa *et al.*, 1990; Mesquita, 1996).

Sano *et al.* (1991), realizaram contagem das NORs em 32 casos de carcinomas epidermóides de boca, fazendo correlação com gradação histológica e prognóstico. A contagem média das NORs/núcleo em carcinomas de prognóstico ruim foi maior do que em carcinomas de prognóstico bom. Os autores concluíram que o aumento dos números

médios de NORs/núcleo nesses tumores é sugestivo de comportamento agressivo, indicando um prognóstico ruim na cavidade oral.

Em 1992, Cabrini *et al.* realizaram um estudo morfométrico das NORs em que analisaram-se a distribuição, o volume, o número e a forma em diferentes camadas do epitélio normal da mucosa bucal, papiloma e carcinoma epidermóide de boca. Os achados demonstraram que os parâmetros da NORs foram diferentes entre mucosa normal, papiloma e carcinoma epidermóide. E, ainda, NORs irregulares, aumentadas em número e diminuídas em tamanho, representam uma expressão da alteração do mecanismo de proliferação e diferenciação, juntamente com a síntese de proteínas oncogênicas presentes em carcinomas.

Yoshimi *et al.* (1993) estudaram alterações das NORs durante o processo de carcinogênese induzida pelo tratamento da mucosa jugal de hamster com DMBA. Os autores relataram que, embora em número absoluto fossem afetadas pelo tratamento com DMBA, as NORs sofreram alterações morfológicas significativas, com aumento na porcentagem das NORs dispersas, com a evolução do processo e o avanço da atipia celular. Alguns autores concluíram que o número de NORs não diminuiu de forma adequada nas lesões pré-cancerosas do grupo das neoplasias e que as alterações morfológicas nas NORs produzidas pelos carcinógenos sugerem alto grau de atividade e são representativas nos estágios precoces de carcinogênese.

Schwint *et al.* (1994), realizaram um estudo morfométrico das NORs em epitélio de mucosa bucal adjacente ao carcinoma epidermóide e compararam com epitélio de mucosa normal e parênquima carcinomatoso. Os resultados evidenciaram diferença estatística significativa entre mucosa normal e carcinoma, em relação aos parâmetros morfométricos do núcleo. Além disso, os autores relatam que o AgNOR é um método útil e de fácil execução em laboratório, que pode ser usado para detectar alterações celulares incipientes, sendo uma contribuição para um diagnóstico fácil e um conhecimento do crescimento tumoral.

Zaczek *et al.* (1994), avaliaram a relação entre a espessura do tecido e a fixação apropriada das proteínas nucleolares associadas as NORs. Os espécimes com espessura de fixação de 3 cm de diâmetro exibiram NORs grandes, agregadas e números baixos. Os espécimes fixados com espessura de 0.5 cm exibiram NORs pequenas, dispersas e números altos. Como conclusão, os autores relataram que em espécimes espessos, a penetração do fixador é dificultada, portanto a fixação das proteínas associadas as NORs não ocorre devidamente, provocando assim, uma interpretação incorreta dos resultados.

Magalhães (1994), avaliou os parâmetros quantitativos, morfométricos e morfológicos das NORs em 20 casos de lesões ósseas dos maxilares. Neste trabalho, foi utilizado o método visual e computadorizado para análise

quantitativa e para a área, perímetro e forma apenas o computadorizado. Os resultados mostraram eficiência da análise das NORs em patologia óssea, bem como a vantagem da utilização do método computadorizado na análise das NORs.

Hernandez-Verdun & Roussel (1995), identificaram as proteínas AgNOR em fases específicas do ciclo celular. Durante a intérfase as maiores proteínas AgNOR em humanos e linhagem celular de hamster, são a nucleolina ou C23 e B23. Durante a mitose, a maior proteína AgNOR associada com os genes ribossômicos é a RNA polimerase I. Em células malignas as NORs estão aumentadas em número, quando comparadas com as células benignas.

Costa *et al.*, (1997), realizou dupla marcação PCNA/AgNOR e Ki67 em carcinoma epidermóide de boca e ressaltou que a utilização da técnica histoquímica AgNOR é bastante sensível a vários fatores como; fixação do tecido, espessura do fragmento fixado, luz, temperatura e a preparação das soluções empregadas. Deve ser utilizada com critério e cuidado para a obtenção de um bom resultado.

Barros, (1999), avaliou a confiabilidade da técnica AgNOR para estabelecer diagnósticos diferenciais de lesões pré-neoplásicas, de graus de malignidade entre neoplasias benignas e malignas e auxiliar no prognóstico e

terapêutica do câncer de boca. A autora concluiu que a contagem das NORs/núcleo pela técnica do AgNOR mostra a proliferação celular e pode ser indicativo de comportamento tumoral, além de ser um método de fácil realização e interpretação. Quanto maior o número de NORs/núcleo, forma irregular, tamanho diminuído e dispersas no núcleo, estas características são indicativos de um pior diagnóstico.

Costa Filho *et al.*, (2002) realizou um estudo histológico em humanos fumantes e não fumantes utilizando peróxido de carbamida 10% por 5 semanas. Foram realizadas 2 biópsias do tecido gengival, uma 15 dias após o início do tratamento e outra imediatamente após completar 5 semanas de tratamento. Posteriormente, foram realizadas análise morfométrica e imunohistoquímica, através da biópsia do tecido gengival. Os autores observaram após o clareamento um espessamento da camada epitelial nos pacientes fumantes e não fumantes. Como conclusão verificaram que o peróxido de carbamida 10% aumentou a atividade proliferativa celular das camadas basal e parabasal do epitélio gengival, resultando em uma mudança da morfometria do tecido.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho consiste em analisar o potencial das substâncias clareadoras dentais, verificando-se, quantitativamente as regiões organizadoras nucleolares (NORs) em carcinomas epidermóides desenvolvidos em hamsters, a partir do modelo DMBA-indução + peróxido de carbamida a 10%, com a utilização da técnica histoquímica AgNOR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para o presente trabalho, foram utilizados cortes histológicos de carcinomas epidermóides desenvolvidos na borda lateral da língua de hamsters.

Estes cortes foram obtidos a partir de 70 hamsters sírios dourados, divididos em 7 grupos de 10 animais, os quais foram submetidos ao modelo DMBA-indução para carcinogênese química no período de 20 semanas. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- I. Acetona;
- II. Peróxido de carbamida a 10% com carbopol (Opalescence);
- III. Peróxido de carbamida a 10% sem carbopol (White & Brite);
- IV. DMBA (dimetil-benzantraceno);
- V. DMBA + peróxido de carbamida a 10% com carbopol;
- VI. DMBA + peróxido de carbamida a 10% sem carbopol;
- VII. Água destilada.

Em estudo prévio, Pieroli (1997) avaliou os agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10% no modelo DMBA, obtendo maior resultado de carcinomas invasivos e microinvasivos nos grupos em que

se associou o clareador + DMBA do que quando se usou o DMBA (ácido dimetil-benzanthraceno) sem o clareador.

Os resultados deste trabalho estão descritos na tabela 4.1 e representados esquematicamente na figura 4.1.

Carcinomas com severo grau de invasão foram desenvolvidos nos grupos V e VI (figura 4.1).

A análise histológica realizada com coloração H. E. revelou a presença de carcinomas epidermóides em microscopia de luz, caracterizados pela proliferação das células epiteliais, com infiltração para os tecidos adjacentes, invadindo o tecido muscular da língua. Esta invasão é característica de malignidade, presença de mitoses, múltiplas e atípicas, pleomorfismo nuclear, hipercromatismo do núcleo, pérolas córneas, hipoplasia e hiperqueratose (figura 4.2).

Com os resultados obtidos, concluímos que os agentes clareadores à base de peróxido de carbamida a 10% atuaram como um promotor da carcinogênese, tendo um potencial co-carcinogênico.

Nessa segunda fase do trabalho, com os espécimes emblocados em parafina, realizamos uma coloração histoquímica AgNOR específica para avaliar a intensidade da proliferação celular, com a visualização do número de NORs nos carcinomas desenvolvidos.

4.2 Técnica Histoquímica AgNOR

A técnica histoquímica AgNOR, descrita por Ploton *et al.* (1986) para a análise das NORs, está descrita a seguir:

1. cortes de 3 micrômetros de espessura foram estendidos sobre a lâmina de vidro e desparafinizados em xilol durante 30 minutos em estufa a 57⁰ C por 20 minutos em temperatura ambiente.
2. etanol absoluto por 20 minutos;
3. imersão em solução de ácido acético/etanol (1: 3) por 5 minutos;
4. lavagem em etanol absoluto por 3 vezes;
5. imersão em celuidina a 1% em etanol/éter (1:1) durante 1 minuto;
6. secagem da lâmina por 1 hora
7. etanol 70% por 5 minutos para endurecer a celuidina;
8. lavagem com água destilada;
9. preparo de 2g/dl de gelatina em 1g/dl de ácido fórmico aquoso, misturando-se com 2,5 g/5 ml de solução de nitrato de prata (1: 2);
10. gotejamento sobre os cortes e incubação em estufa a 45⁰C em câmara úmida por 30 min.;
11. lavagem vigorosa com água destilada a 45⁰C;

12. desidratação com etanol em concentrações crescentes, clareados em xilol e montados em *Permount^R*.

4.3 Contagem das NORs

Realizada a técnica, fez-se a contagem das NORs, por meio de um sistema computadorizado em que se utilizou um *software* ImageLab 2000, após a sua individualização por subtração de imagens. As imagens de cada campo foram obtidas a partir de um microscópio de luz LABORVAL 4 com objetiva de imersão e aumento final de 1000x. Essas imagens foram captadas por uma câmera e transferidas para um computador. Foram analisados 100 núcleos celulares de cada lâmina, escolhidos ao acaso, e avaliadas 3 lâminas por grupo.

Este sistema é composto por uma câmera SONY Digital Hyper HAD acoplada a uma placa Captvator, que congela a imagem que será processada pelo programa ImageLab 2000. O *software* foi desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (L.I.D.O.), do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A característica principal deste programa consiste em analisar as estruturas de uma imagem pelo tom das cores vermelho, verde e azul, sistema RGB. Tornou-se possível fazer a individualização das NORs por subtração de imagem e, assim, realizar as análises quantitativas do número de NORs/núcleo.

4.4 Representação dos resultados obtidos no estudo de Pieroli (1997)

citado no item 4.1 deste capítulo

Tabela 4.1 - Distribuição dos aspectos morfológicos decorrentes da carcinogênese induzida, no período de 20 semanas (Pieroli, 1997)

Grupos	Número de animais	Hiperplasia intensa	Displasia	Carcinoma invasivo	Carcinoma micro-invasivo
I	10	-	-	-	-
II	7	-	-	-	-
III	9	-	-	-	-
IV ^Δ	10	-	4	3	3
V*	9	-	-	7	2
VI*	9	1	-	8	-
VII	6	-	-	-	-

• Diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,01$) (variações de Kruskal Wallis)

* Não houve diferença estatística entre estes grupos (teste de Mann Whitney).

^Δ Diferenças significantes entre os grupos V e VI ($p < 0,05$) (teste de Mann Whitney)

Figura 4.1 - Distribuição gráfica dos aspectos morfológicos decorrentes da carcinogênese induzida, no período de 20 semanas (Pieroli, 1997)

Figura 4.2 – (A) Aspecto macroscópico das lesões desenvolvidas nos grupos (V e VI – Peróxido de carbamida 10% + DMBA), destacando formações exofíticas na mucosa lingual de hamster sírio dourado em estágio avançado de carcinoma epidermóide, sangrantes ao toque, após período de 20 semanas. (B) Aspectos microscópicos do carcinoma epidermóide DMBA-induzido bem diferenciado na borda lateral lingual, evidenciando a desorganização epitelial, com invasão da submucosa. Observam-se o comprometimento acentuado da camada muscular e o limite do tecido muscular normal (seta) (40X H. E). (C) Notar a invasão tecidual das ilhotas do epitélio, comprometendo a camada muscular da língua (seta), p = (pérolas córneas), cm = (camada muscular), v = vasos sanguíneos congestos, Ca = carcinoma (40X H.E.). (D) Destaque da invasão e destruição das fibras musculares esqueléticas. M = mitose atípicas, hm = hiperchromatismo, f = fibras musculares, pleomorfismo celular (seta), (1000X H. E.)

5 RESULTADOS

5.1 Análise Quantitativa das NORs

As NORs foram observadas como pontos acastanhados a negros no interior do núcleo, apresentando-se, no geral, como estruturas pequenas e irregulares nos grupos com atipia severa (figura 5.1 - C, D, E, F, G e H)

Os resultados originais consistiam de valores de número de NORs referentes a 7 grupos: (G I Acetona); (G II peróxido de carbamida 10% com carbopol); (G III peróxido de carbamida 10% sem carbopol); (G IV DMBA); (G V DMBA + peróxido de carbamida 10% sem carbopol); (G VI DMBA + peróxido de carbamida 10% com carbopol) e (G VII água destilada). Foram consideradas 3 lâminas para cada grupo e 100 células para cada lâmina.

Para cada lâmina foi somado o número de NORs, resultando num total de 21 valores (tabela 5.1).

Tabela 5.1. Número de NORs por lâmina em cada grupo

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
Lâmina 1	245	257	271	226	402	361	285
Lâmina 2	248	307	293	272	440	391	260
Lâmina 3	262	292	274	301	311	393	268
Média	251,66	285,33	279,33	266,33	384,33*	381,66*	271

* Significante ao nível de 5%

Esses dados foram analisados estatisticamente com auxílio do *software* GMC, versão 8.1, com o qual foi realizado uma Análise de Variância (tabela 5.2).

Tabela 5.2- Análise de Variância para comparação entre os grupos

Fonte de Variação	Soma Quadrados	G.L.	Quadr. Médios	(F.)
Entre grupos	56037.2500	6	9339.5420	9,09 *5%
Resíduo	14384.000	14	1027,4286	
Variação total	70421.2500	20		

*significante ao nível de 5%

Com base nesta Análise de Variância, verifica-se que houve significância estatística ao nível de 5 % entre os grupos ($F = 9,09$).

Para a comparação entre as médias dos grupos, foi realizado o teste de Tukey ($T = 89,38$) ao nível de 5%, que revelou: os grupos I (média = 251,67), grupo II (média = 285,33), grupo III (média = 279,33),

grupo IV (média = 266,33) e grupo VII (média = 271,00) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e se demonstraram com valores menores que os grupos V (média = 384,33) e VI (média= 381,33), que também não foram diferentes entre si.

Para possibilitar a diferenciação entre os grupos I, II, III, IV e VII; foram avaliados os números de ocorrências de NORs/núcleo, obtendo-se a tabela 5.3

Tabela 5.3 - Ocorrência de NORs/núcleo

Nº de NORs	1	2	3	4	5	6	7	Total de células
G I	15	145	110	30	0	0	0	300
G II	10	109	129	51	1	0	0	300
G III	1	100	159	39	1	0	0	300
G IV	60	99	65	42	27	5	2	300
G V	16	27	82	84	52	32	7	300
G VI	18	35	78	87	45	27	10	300
G VII	3	120	141	33	3	0	0	300

A literatura relata que em células neoplásicas malignas, com maior atividade proliferativa, as NORs são mais numerosas e menores, apresentando-se de forma irregular, quando comparadas com células neoplásicas benignas. Estas, com menor atividade proliferativa, nas quais as NORs estão presentes em menor número, são maiores e de forma

regular (Derenzini *et al.*, 1991; Freitas, 1991; Delahunt *et al.*, (1993); Fujita *et al.*, 1992; Magalhães, 1994).

Nos grupos em que se desenvolveram os carcinomas a ocorrência acima de 4 NORs/núcleo, ou seja, 5, 6 ou 7 NORs, foi maior do que nos grupos sem carcinoma.

Com base neste fato, foram tabelados os números de ocorrências de NORs/núcleo a partir de 5 NORs/núcleo para cada grupo, obtendo-se a tabela 5.4

Tabela 5.4 - Frequência de ocorrências acima de 5 NORs/núcleo

G I	G II	G III	G IV	G V	G VI	G VII
0	1	1	27	52	45	3

Com esses dados, foi realizado o teste do Qui-quadrado, para comparar as frequências obtidas, cujos resultados são apresentados a seguir.

Este teste não permite a ocorrência da frequência zero, razão pela qual o grupo I foi removido das comparações. Então, a próxima comparação ocorreu entre os grupos II, III, IV, V, VI e VII (tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Frequências comparadas envolvendo os grupos II, III, IV, V, VI e VII

G II	G III	G IV	G V	G VI	G VII	
1	1	27	52	45	3	129

Os resultados do Qui-quadrado mostraram haver diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 125,37$). Ou seja, houve diferença na frequência das células com 5 ou mais NORs/núcleo entre os grupos analisados.

Para localizar melhor essa diferenciação, removemos os grupos II e III (com as menores frequências) e executamos novamente o teste (tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Frequências comparadas envolvendo os grupos IV, V, VI e VII

G IV	G V	G VI	G VII	
34	91	82	3	210

O teste do Qui-quadrado apresentou ainda diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($X^2 = 98$). Ou seja, entre esses grupos IV, V, VI e VII também ocorreu diferença.

Removeu-se então o grupo VII, com a menor frequência (tabela 5.7) e executou-se novamente o teste.

Tabela 5.7 - Frequências comparadas envolvendo os grupos IV, V e VI

G IV	G V	G VI	
34	91	82	207

Nesta comparação, verificou-se ainda ocorrer diferença estatística entre os grupos ($X^2 = 27,22$), supondo-se que o grupo IV é menor que os grupos V e VI.

Para confirmar isso, foi removido o grupo IV (tabela 5.8) e executou-se novamente o teste. Verificou-se então não ocorrer diferença entre os grupos V e VI, conforme já verificado na primeira Análise de Variância ($X^2 = 0,47$).

Tabela 5.8 - Frequências comparadas envolvendo os grupos V e VI

G V	G VI	
91	82	173
91	82	173

Com essas análises, pôde-se concluir que, de acordo com as frequências das ocorrências de NORs/núcleo, os grupos V e VI apresentaram a maior ocorrência acima de 4 NORs/núcleo em cada célula. O grupo IV apresentou maior ocorrência que os grupos I, II, III e VII e menor que os grupos V e VI.

Figura 5.1 – Aspectos microscópicos das lâminas utilizando a técnica histoquímica AgNOR.

a) **(A e B)** Aspectos microscópicos do tecido epitelial nos grupos II e III (peróxido de carbamida 10%) utilizando a técnica histoquímica AgNOR. **(A)** Observa-se NORs nas células epiteliais com formas regulares, grandes e arredondadas com frequência de 1 a 3 NORs/núcleo (seta). (400X)

b) **(C)** Aspecto microscópico do carcinoma invasivo epidermóide, DMBA-induzido, desenvolvido no grupo IV (DMBA) (25X). **(D)** observamos NORs nos núcleos celulares: pequenas, irregulares e com frequência de 3 a 5 NORs/núcleo (seta) (400X).

c) **(E, F, G, H)** Aspectos microscópicos das NORs no carcinoma epidermóide invasivo desenvolvido no modelo DMBA-indução nos grupos V e VI (peróxido de carbamida 10% + DMBA). **(E)** Observar presença de pérolas córneas, pleomorfismo celular com atipia severa. **(F)** Presença de núcleos celulares com NORs pequenas, irregulares e em maior número com frequência de 5 a 7 NORs/núcleo em cada célula (seta), compatível com a severa atipia celular desenvolvidas nestes grupos. **(G e H)** Observar NORs nas células tumorais pulverizadas e em maior número (seta). (AgNOR - 400X)

6 DISCUSSÃO

A grande preocupação em relação à utilização dos agentes clareadores caseiros refere-se ao tempo de contato prolongado com os tecidos moles e a seus possíveis efeitos sistêmicos. Sabe-se que algumas reações adversas reversíveis, como sensibilidade pós-operatória, podem ocorrer durante o tratamento, porém a longo prazo, os seus efeitos ainda são desconhecidos (Isquierdo, 1979; Christensen, 1991; Sporn, 1991; Goldstein & Kiremidjian-Schumacher, 1993). Vários autores demonstram suas inquietações quanto à citotoxicidade do peróxido de carbamida e à presença dos radicais livres como seu subproduto (Salley, 1957; Rees & Orth, 1986; Robins *et al.*, 1989; Rubin & Farber, 1990; Powell & Bales, 1991; Gage *et al.*, 1992; Cherry *et al.*, 1993; Powers & Farah, 1996).

Depois de uma década de uso dos agentes clareadores, ainda se questiona sobre sua segurança quanto aos efeitos sistêmicos de sua utilização em larga escala e tempo prolongado, sobre seus efeitos na estrutura dental (Berry, 1990; Anderson, 1991; Dishmann & Baughan, 1992; Gage *et al.*, 1992; Strassler *et al.*, 1992; Tam, 1999 e 2001; Cimilli & Pameijer, 2001; Leonard *et al.*, 2001).

O ingrediente ativo do peróxido de carbamida é o peróxido de hidrogênio. Durante o processo clareador, ocorre a liberação de radicais livres por oxidação, como os íons hidroxila e ânions superóxidos, que são

espécies reativas e podem promover tumores (Rees & Orth, 1986; Weitzmann *et al.*, 1986; Larson, 1990).

O mecanismo de ação desses radicais ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que uma quantidade de H_2O_2 pode penetrar nas células e danificar seus componentes internos depois de consumir os seus mecanismos de proteção (Cantoni *et al.*, 1986). Em condições normais, os mecanismos de proteção a esses radicais são adequados para prevenir extensos danos nas células. Entretanto, quando uma quantidade excessiva de radicais de oxigênio está dentro da célula, ocorre uma sobrecarga nas defesas intracelulares, causando a sua morte (Carlsson, 1987).

O organismo possui mecanismos de defesas bioquímicas intracelulares que reagem com os radicais livres para inativá-los, como o sistema enzimático. Porém, este mecanismo pode sofrer interferências no processo de reparo, causando alterações e, possivelmente, permitindo a fixação da lesão na célula. Os radicais livres, quando entram nas células rapidamente, são combatidos; entretanto, dependendo da quantidade e do tipo de radicais, alguns não são eliminados e provocam reações indesejáveis, como danos ao DNA, ocorrência que pode ser o início para a produção de um tumor (Fridovich, 1978; Freeman & Crapo, 1982).

Os clareadores, quando lançados para o uso caseiro, foram considerados como produtos cosméticos pela FDA (U.S. Food and Drug Administration). Em 1992, porém, foram reclassificados como drogas, com a recomendação de serem reexaminados até que pesquisas sobre a

segurança do produto fossem concluídas (Sporn, 1991; Tam, 1992; Howard, 1992; Dishman & Baughan, 1992; Goldstein & Kiremidjian-Schumacher, 1993).

Atualmente, alguns clareadores possuem o selo de aceitação da ADA (ADA Seal of Acceptance). Nos EUA, os produtos contendo 3% ou menos de peróxido de hidrogênio são aceitos pelo FDA. No Canadá, estes produtos não são utilizados por períodos superiores a 14 dias, e as concentrações do peróxido de carbamida e de hidrogênio não devem ser superiores a 10% e 3%, respectivamente (Tam, 2001).

A técnica caseira de clareamento prescrita nos dias de hoje pode durar de 2 até 6 meses de uso da substância, sendo que os estudos clínicos que enaltecem o tratamento se baseiam em técnicas com tempo de curta duração. A ação da substância sobre os tecidos bucais por períodos prolongados deveria ser melhor avaliada (Tam, 2001).

Atualmente, com a crescente industrialização, as substâncias químicas possuem grande importância na indução de cânceres em humanos (Shklar, 1968; Miller, 1978; Saltz, 1988).

As substâncias químicas, potencialmente carcinogênicas, parecem ser a causa mais importante e conhecida de câncer, pois as frequentes exposições a elas, em consequência dos hábitos alimentares e sociais (como bebidas alcoólicas e cigarro) e dos poluentes ambientais, passaram a exercer, ao longo tempo, influência sobre o desenvolvimento dessa doença (Miller & Miller, 1981; Nelson, 1981; Rees & Orth, 1986; Higginson, 1993).

A carcinogênese constitui um processo dinâmico, caracterizado por múltiplas etapas, definidas como: *iniciação, promoção, progressão e manifestação*. (Beremblum, 1941; Fujita, 1973a; Guimarães, 1982; Odukoya & Shklar, 1982 e 1984; Rubin & Farber, 1990; Higginson, 1993).

Agente iniciador é aquele que propicia uma alteração permanente nas células, e estas podem evoluir para uma neoplasia, de forma lenta ou rápida, dependendo da interação com um agente promotor (Rodrigues & Camargo, 1992; Robins *et al.*, 1989; Rubin & Farber, 1990; Guimarães, 1982).

Os agentes promotores representam papel importante no desenvolvimento do câncer em seres humanos, pelo fato de serem abundantes no meio ambiente. Podem ser fatores exógenos, tais como químicos, físicos e biológicos, os quais estão relacionados ao estilo de vida e aos hábitos alimentares do indivíduo; ou fatores endógenos, como fatores genéticos, hormonais e imunológicos (Harris, 1973; Miller, 1978; Miller & Miller, 1981; Simonsen, 1990; Higginson, 1993; Hays *et al.*, 1995).

O aparecimento do câncer não está na dependência de um ou outro fator de risco isolado, mas é fruto da interação de vários fatores de risco, em maior ou menor grau, que podem danificar o equilíbrio celular, causando alterações irreversíveis no DNA das células, desenvolvendo então as neoplasias (Mendonça, 1992).

Na vida moderna, é praticamente impossível a uma pessoa ficar protegida da ação de inúmeros iniciadores provenientes do nosso meio ambiente, dos hábitos sociais e dos hábitos alimentares (Barreto Neto,

1992). Cerca de 80% de todos os cânceres humanos são de origem ambiental, sendo suas causas atribuídas aos mais variados fatores do meio ambiente (Higginson, 1993).

Desta maneira, a prevenção da carcinogênese deve ser feita a partir da menor exposição possível aos agentes químicos já conhecidos que atuam na fase de promoção das neoplasias.

Neste contexto, o uso prolongado dos agentes clareadores caseiros à base de peróxido de carbamida a 10% coloca o peróxido de hidrogênio, uma substância com potencial para alterações celulares, em contato direto com a mucosa bucal por várias horas, expondo o paciente a riscos com este tipo de tratamento (Hirota & Yokoyama, 1981; Weitzmann *et al.*, 1986).

Os radicais livres, subprodutos da dissociação do peróxido de hidrogênio ao entrarem nas células são rapidamente combatidos. Entretanto, dependendo da quantidade e do tipo de radicais, alguns não são eliminados e provocam reações indesejáveis, como danos ao DNA, o que pode representar o estímulo inicial necessário para a produção de um tumor (Fridovich, 1978; Freeman & Crapo, 1982).

Em estudo realizado por Pieroli (1997), em que se testou a carcinogenicidade dos agentes clareadores bucais no modelo DMBA-indução, pôde-se observar nos cortes histológicos dos carcinomas epidermóides desenvolvidos, utilizando coloração H. E., que os grupos testados apresentam diferentes resultados quanto ao potencial carcinogênico. Nos **Grupos I** (Acetona), controle do DMBA (ácido dimetil-

benzantraceno), e **Grupo VII** (Água destilada), controle geral, não houve desenvolvimento de lesões neoplásicas e/ou displásicas e manteve-se a normalidade até o final do experimento. Nos **Grupos II e III**, que receberam apenas o peróxido de carbamida a 10% com carbopol (Opalescence) e sem carbopol (White & Brite), respectivamente, não houve alterações displásicas, mas inflamação da mucosa, o que revela que o peróxido de carbamida a 10% isoladamente não foi capaz de iniciar neoplasias. No **Grupo IV** (DMBA), de 10 animais, 60% desenvolveram carcinomas e, 40% displasias intensas, no período de 20 semanas. Entretanto, no **Grupo V** (peróxido de carbamida a 10% com carbopol (Opalescence + DMBA), dos 9 animais todos desenvolveram carcinomas invasivos ou microinvasivos (100%) e no **Grupo VI** (peróxido de carbamida a 10% sem carbopol (White & Brite) + DMBA), de 9 animais, 1 apresentou hiperplasia intensa e 8 carcinomas invasivos (90%). Nos grupos V e VI, em que os clareadores foram associados ao DMBA, houve o desenvolvimento de lesões neoplásicas; mais especificamente, carcinomas epidermóides, com severo grau de invasão, no período de 20 semanas, quando comparados com o grupo IV, que recebeu apenas o DMBA (figura 4.1).

No entanto, esses clareadores testados em associação com o DMBA exacerbaram as modificações teciduais e neoplásicas, com o desenvolvimento de lesões mais severas quando comparadas ao DMBA (Grupo IV), estabelecendo assim uma ação na fase promotora do desenvolvimento tumoral.

Com base nestes resultados, os autores classificaram o peróxido de carbamida como uma substância co-carcinogênica, responsável pelo desenvolvimento, nos grupos avaliados, de severos carcinomas. Contudo, o trabalho anteriormente descrito em que se utilizou a técnica H.E. de coloração histoquímica foi incapaz de determinar alterações celulares em estágios iniciais de lesões neoplásicas.

Desta forma, intencionou-se realizar um novo trabalho, reavaliando, nesse momento, os carcinomas epidermóides desenvolvidos com a associação do peróxido de carbamida 10% + DMBA. Utilizou-se uma técnica histoquímica, como o AgNOR, mais específica e eficiente para avaliar células neoplásicas com mais profundidade e, de forma mais ampla, a proliferação celular nos carcinomas desenvolvidos.

A técnica histoquímica AgNOR foi simplificada por Howell & Black (1980). Primeiramente, foi aplicada em sessões histológicas por Ploton *et al.* (1986), que decreveram uma técnica modificada e para a demonstração das NORs em vários espécimes biológicos, incluindo células cultivadas e tecido embocado em parafina ou material plástico. Esta técnica ficou conhecida como AgNOR, em que as NORs são visualizadas na microscopia de luz como pontos negros intranucleares (Aguilar, 1996; Mesquita, 1996).

De acordo com Kahn *et al.* (1993), esta técnica é um método simples, de fácil execução, baixo custo e reproduzível na rotina dos laboratórios de patologia. Porém, alguns autores ressaltam ser uma técnica bastante sensível em todos os seus passos durante a sua realização e recomendam

muito critério em todas as suas fases para se obter um bom resultado. (Crocker & Nar, 1987; Nunes *et al.*, 1990; Zaczek *et al.*, 1994; Shwint *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1996; Barros, 1999).

As NORs (regiões organizadoras nucleolares) são alças de DNA que contêm genes ribossômicos e que estão diretamente relacionadas com a síntese protéica, estando ativadas e aumentadas em número de acordo com o aumento da atividade celular (Crocker & Nar, 1987).

A técnica AgNOr consiste em coloração pela prata de proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs), que permitem identificar, por meio da análise quantitativa e morfométrica dessas regiões, a atividade proliferativa celular. A prata utilizada é reduzida em micronúcleos de prata, os quais são depositados dentro dos núcleos celulares, onde se revela a posição ativa da transcrição das NORs nos núcleos celulares, podendo ser utilizada para obter informação sobre a estrutura dos nucléolos e a atividade nucleolar em condições hiperplásicas e neoplásicas (Hernandez-Verdun & Fakan, 1986; Walker, 1988; Matolcsy *et al.*, 1992).

Existem várias proteínas que estão localizadas adjacentes às NORs, atuando na descondensação e/ou na transcrição do DNAr e na maturação do RNAr. Uma dessas proteínas, que é a mais estudada, recebe a denominação de Ag-Nor. Sendo uma proteína não-histônica e argirofílica, sua natureza bioquímica é controversa. É considerada como marcadora da atividade e do potencial de transcrição do DNAr, devido a sua capacidade corante pela prata. Com a técnica de coloração por prata, conhecida como

AgNOR, essas regiões são intensificadas em material histológico. Os grupos carboxílicos nas proteínas não-histônicas reduzem a solução de prata em micronúcleos de prata, os quais formam grandes agregados, que são depositados em sítios de grupos dissulfídricos e sulfidrílicos, os quais se tornam claramente visíveis na microscopia de luz como pontos negros dentro dos núcleos celulares. Assim, a técnica do AgNOR revela a posição ativa de transcrição da NOR dentro dos núcleos celulares, sendo muito utilizada para obter informação sobre a estrutura dos nucléolos e a atividade nucleolar em condições hiperplásicas e neoplásicas (Buys & Osing, 1980; Hernandez-Verdun & Fakan, 1986; Walker, 1988; Matolcsy *et al.*, 1992; Hernandez-Verdun & Roussel, 1995; Mesquita, 1996).

Para a contagem das NORs/núcleo, pode ser utilizada a contagem visual em microscópio de luz, com aumento final de 1000x (Crocker & Nar, 1987; Delahunt *et al.*, 1991; Delahunt *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1992) ou podem ser utilizados sistemas computadorizados mediante o uso de um *software* que realiza as medidas de uma estrutura digitalizada. A característica principal deste sistema consiste em analisar as estruturas de uma imagem pelos tons de cores vermelho, verde, azul (sistema RGB), em que é possível fazer a individualização das NORs na imagem captada e, a partir daí, realizar as análises quantitativas e morfométricas. Alguns autores, como Magalhães (1994); Mesquita (1996); Aguiar (1996) e Costa (1997), utilizaram em seus trabalhos este sistema computadorizado de forma satisfatória para a análise morfométrica e morfológica precisa das NORs. Em

nosso trabalho, foi utilizada metodologia semelhante para a contagem e análise das NORs, sendo em nosso estudo avaliada a quantidade de 100 núcleos celulares, escolhidos ao acaso, baseando-se em trabalhos em que a quantidade de núcleos analisados variou em 100, 200 e 300 (Crocker & Nar, 1987; Delahunt *et al.*, 1993; Delahunt *et al.*, 1993; Magalhães, 1994; Mesquita, 1996; Magalhães & Araújo, 1996; Aguiar, 1996).

A análise qualitativa, em que se levaram em consideração os parâmetros morfométricos e morfológicos das NORs, demonstra que em lesões malignas, além de maior número, as NORs encontram-se diminuídas em tamanho, amplamente dispersas pelo núcleo e com forma e contornos irregulares (Yang *et al.*, 1990; Cabrini *et al.*, 1992).

As NORs são sítios de ligação de um grupo peculiar de proteínas acídicas não histônicas (RNA polimerase I, C23 ou nucleolina e B 23) que estão envolvidas na organização funcional e estrutural dos nucléolos e sempre associadas com a cromatina nucleolar (Derenzini *et al.*, 1990; Hernandez-Verdun & Roussel, 1995).

A utilização da coloração pela prata para a identificação de NORs foi primeiramente desenvolvida para demonstrar NORs de cromossomos, avaliando sua função e identificando cromossomos em preparações citogenéticas (Goodpasture & Bloom, 1975).

Revisando a literatura sobre a técnica AgNOR, observa-se uma concordância no valor da avaliação das NORs como um marcador de proliferação celular em processos hiperplásicos e neoplásicos, benignos e

malignos e, conseqüentemente, como auxiliar de diagnóstico (Sano *et al*, 1991; Freitas, 1991; Derenzini *et al*, 1991; Cabrini *et al*, 1992; Magalhães & Araújo, 1996; Mesquita, 1996).

A partir da avaliação dos resultados do peróxido de carbamida 10% ter um potencial co-carcinogênico com o desenvolvimento de carcinomas epidermóides com um sério grau de invasividade desenvolvido no modelo de DMBA-indução, pôde-se, a partir daí, fazer uma avaliação mais minuciosa e específica da proliferação neoplásica desenvolvida nos espécimes utilizando a técnica de AgNOR.

A base desta avaliação está fundamentada no fato de que em células neoplásicas malignas, com maior atividade proliferativa, as NORs são mais numerosas, menores e apresentam-se de forma irregular, quando comparadas com células neoplásicas benignas, com menor atividade proliferativa, nas quais as Nors estão presentes em pequeno número, são maiores e de forma regular (Crocker & Nar, 1987; Sano *et al.*, 1991; Freitas, 1991; Magalhães, 1994; Mesquita, 1996, Barros, 1999).

Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram um maior número de NORs/núcleo nos Grupos em que utilizamos peróxido de carbamida 10% + DMBA (Grupos V e VI) do que no grupo em que foi utilizado apenas o DMBA (Grupo IV).

Nos grupos IV, V e VI, as NORs se encontram dispersas e difusamente distribuídas no núcleo, são maiores, irregulares e são vistas

como múltiplos grânulos de formas bizarras e densas. Estes aspectos estão de acordo com a intensa atividade proliferativa celular.

Nos grupos V e VI, em que se desenvolveram severos carcinomas, constatamos intensa proliferação celular, com ocorrência de NORs acima de 4 NORs/núcleo, alteradas no interior do núcleo, fato compatível com o desenvolvimento e a intensidade da lesão, confirmando a proliferação celular maior e mais intensa nestes grupos do que o ocorrido no grupo IV, DMBA. Neste grupo houve desenvolvimento de lesões, porém com ocorrência de NORs menores que nos grupos em que se associaram DMBA + agentes clareadores.

Esses resultados revelam uma potencialização dos clareadores quando utilizados associados com o DMBA, possivelmente pela ação na fase de promoção da carcinogênese química no desenvolvimento destas neoplasias, o que sugere que os clareadores agiram como promotores na estimulação da proliferação celular, levando ao desenvolvimento do carcinoma, corroborando com os resultados de Pieroli (1997).

Porém, nos grupos II e III, em que os peróxidos foram usados sozinhos (relembremos que a ação isolada de uma substância química na cavidade bucal é praticamente impossível), não foram constatadas alterações nos números de NORs compatíveis com neoplasia. Isto pressupõe que os clareadores não iniciaram e não promoveram lesões mesmo em estágios iniciais de proliferação. A comparação entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis foi significativa ao nível de 5%.

No grupo IV, DMBA, a ocorrência de NORs/núcleo foi menor do que nos grupos V e VI. Com base nestes resultados, sugerimos que o agente clareador estimulou a proliferação celular, tendo um efeito promotor nesta atividade. Estes resultados corroboram com estudo anteriormente realizado quanto à toxicidade dos agentes clareadores (Pieroli *et al.*, 2000).

A alteração das NORs utilizando o DMBA já foi anteriormente avaliada por Yoshimi *et al.*, em 1993, quando utilizaram o modelo de estudo com hamsters para indução de carcinogênese química, constatando alterações nas NORs, induzidas pelo DMBA, em fases iniciais da carcinogênese, sugerindo que as mesmas podem ser usadas como marcadores pré-neoplásicos.

Em um estudo histológico, Costa Filho *et al.* (2002), avaliaram o peróxido de carbamida 10% em humanos fumantes e não fumantes por um período de 5 semanas, usado 8 horas por dia. Após este período, biópsias do epitélio gengival foram realizadas, e a morfometria do epitélio e a proliferação celular foram analisadas por meio da técnica imunohistoquímica (PCNA). Os autores verificaram que o peróxido de carbamida 10% foi capaz de causar alterações morfológicas no epitélio gengival, bem como de aumentar a taxa de proliferação das células epiteliais da camada basal e parabasal do epitélio após a utilização do clareamento. Isto mostrou que o clareador foi um fator importante na proliferação das células, porque foi capaz de estimular a atividade de divisão celular. Os autores observaram ainda que não foi possível concluir que o peróxido de carbamida 10% é

carcinogênico em situações clínicas, mas foi possível observar que ele alterou a proliferação celular e, conseqüentemente, ele pôde agir como um promotor de tumor na presença de células mutantes. Um carcinoma pode originar-se de uma célula mutante, e estudos histológicos mais aprofundados em relação aos clareadores deveriam ser realizados para que fossem utilizados com mais segurança.

Estes resultados corroboram com o nosso trabalho, em que constatamos intensa proliferação celular nos espécimes avaliados com os clareadores em associação ao DMBA. Estes resultados podem ser melhor avaliados na tabela 5.3.

O uso dos clareadores têm sido recomendado por longo período de tempo até 6 meses (Haywood, 1997; Frazier & Haywood, 2000). No tratamento de manchas de nicotina, pode durar 3 meses, e isso significa maior contato com a mucosa, aumentando, assim, os possíveis efeitos que esta substância pode causar nos tecidos (Costa Filho *et al.*, 2002)

Atualmente, a maioria dos profissionais utiliza ou indica a técnica caseira de clareamento, mesmo tendo conhecimento de estudos que mostram e alertam quanto à toxicidade da substância nos tecidos.

Os clareadores ocupam um lugar de destaque nos tratamentos odontológicos estéticos. Novas concentrações são utilizadas para efeitos mais rápidos e eficazes, assim como um tempo mais prolongado de uso é sugerido no tratamento. As concentrações variam de 10%, 15%, 16% até 22% de peróxido de carbamida para uso caseiro. Aumentando a

concentração da substância e o tempo de exposição da mesma em contato com o tecido bucal, aumentam também os riscos dos efeitos químicos dos clareadores na mucosa.

Neste estudo abordou-se este tema por considerá-lo de suma importância, em razão dos achados histológicos, em que, com a técnica AgNOR utilizada, é possível avaliar mais especificamente a gravidade dos carcinomas desenvolvidos pelos clareadores em associação a um carcinógeno. A utilização de marcadores celulares, como o AgNOR, para avaliar a proliferação de células neoplásicas, é considerada uma técnica bastante atual e muito utilizada em patologia bucal.

Consideramos nossos resultados bastante atuais na discussão do uso dos clareadores na técnica caseira, uma vez que esta técnica é cada vez mais utilizada, e com clareadores mais concentrados. Os riscos devem ser avaliados, mesmo que não se tenha até o presente momento relato de pacientes com carcinomas evidentes. Porém, a menor possibilidade existente para que isto ocorra já deveria ser levada em consideração, pois a saúde do paciente deve ser preservada acima de tudo.

O desenvolvimento do câncer envolve várias etapas e múltiplos fatores, como o genético e outros dependentes do ambiente e do estilo de vida. A mudança de fatores ambientais ou de hábitos adquiridos pode auxiliar na redução de alguns tipos de cânceres. É difícil identificar os fatores específicos ambientais ou estabelecer como eles atuam. Certamente, alguns atuam provocando diretamente mudanças genéticas; outros provavelmente,

servem como promotores tumorais e ajudam a aumentar a população de células suscetíveis a progredir, por meio de mais mutações, desenvolvendo o tumor.

Evitar contatos com substâncias conhecidamente carcinogênicas, sejam indutoras ou promotoras, parece-nos uma decisão bastante sensata. Neste aspecto, deveríamos abolir o contato prolongado de clareadores bucais com os tecidos moles dos pacientes.

Sem dúvida, os procedimentos de clareamentos dentais são eficientes e trazem benefícios estéticos inquestionáveis. Porém, diante dos possíveis efeitos indesejáveis, a técnica convencional de clareamento realizada em consultório e com a devida proteção do paciente deveria ser a escolha profissional mais indicada.

O que podemos afirmar é que os agentes clareadores deveriam ser utilizados com mais cautela, pois sabemos que o aparecimento de uma lesão neoplásica depende de vários fatores e de vários momentos celulares na vida de um indivíduo. A menor chance de uma substância química desencadear uma alteração proliferativa nas células, levando ao desenvolvimento de um carcinoma, parece-nos um motivo bastante razoável para repensarmos a necessidade da utilização de tal substância em tratamentos aos nossos pacientes nos consultórios odontológicos.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos da análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares (NORs) nos carcinomas epidermóides desenvolvidos no modelo DMBA-indução + agentes clareadores, concluímos que:

1. O número de NORs/núcleo foi maior nos grupos V e VI (peróxido de carbamida 10% + DMBA), caracterizando maior proliferação das células e maior grau de malignidade dos carcinomas epidermóides desenvolvidos.
2. Nos grupos I (Acetona), II (Opalescence), III (White & Brite) e VII (Água destilada), em que não houve desenvolvimento de carcinomas, o número de ocorrências de NORs/núcleo foi menor que nos demais grupos.
3. No grupo IV (DMBA), o número de ocorrência de NORs/núcleo foi menor que os grupos V e VI (peróxido de carbamida 10% + DMBA).
4. Com as análises desenvolvidas, pôde-se verificar que, de acordo com as freqüências das ocorrências de NORs/núcleo, os grupos V e VI apresentaram a maior ocorrência acima de 4 NORs/núcleo em cada célula. O grupo IV apresentou maior ocorrência que os grupos I, II, III e VII e menor que os grupos V e VI.

REFERÊNCIAS*

- 1 - ADEPT REPORT. Lightening Natural Teeth – **The Adept Institute**. v.2, n. 1, p. 1-24, Winter 1991.
- 2 - AGUIAR, M. C. F. **Estudo comparativo das proteínas p53, PCNA, Hi-67 e das regiões organizadoras nucleolares (NORs) no epitélio de revestimento da mucosa próximo ao carcinoma epidermóide de boca**. 1996. 109 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 3 - AMERICAN DENTAL ASSOCIATION . Council in Dental Therapeutics. Guidelines for the Acceptance of peroxide-containing oral hygiene products. **J.Am. Assoc.**, v. 125, n.2, p.1140-1142, Aug. 1994.
- 4 - ANDERSON, M. H. Dental bleaching. **Curr Opinion Dent**, v. 1, n, 2, p.185-191, Apr. 1991.
- 5 - ANNEROTH, G.; BATSAKS, J.; JUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.95, n. 3, p. 229-249, June. 1987.
- 6 - BAILEY, S. J.; SWIFT Jr, E. J. Effects of home bleaching products on composite resins. **Quintessence Int**, Carol Stream, v. 23, n. 7, p. 489-4, July.1992.
- 7 - BARTLETT, D. W.; WALMSLEY, A. D. Home bleaching. **Dent Update**, London, v. 19, n. 7. p. 287-90, Sept. 1992.

* De acordo com ABNT NBR-6023: 2002. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

8 - BARRETO NETO, M. Patologia ambiental. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 3^a ed.: São Paulo, Ateneu, 1992 p. 217-27.

9 - BARROS, R. M. G. **Análise crítica da Utilização do método de detecção das NORs (AgNOR) na avaliação prognóstica do carcinoma epidermóide de boca**. 1999, 80 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

10 - BERENBLUM, M. D. The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. **Cancer Res**, Chicago, v. 1, p. 807-814, Oct. 1941.

11 - BERRY, J. H. What about whiteners? **J Amer Dent Assoc**, Chicago, v. 121, n. 2, p. 223-5, Aug. 1990.

12 - BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: it is use in histopathology. **Histopathology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 489-503, Dec. 1990.

13 - BUYS, C. H. C. M.; OSING, J. Abundance of protein-bound sulphidryl and disulfide groups at chmosomal nucleolus organizing regions. **Chromosoma**, Berlin, v. 77, n. 13, p.1-11, Aug. 1980.

14 - CABRINI, R. L.; SCHWINT, A. E.; MENDEZ, A.; FEMOPASE, F.; LANFRANCHI, H.; ITOIZ, M. E. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papiloma and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 21, n. 4, p. 275-279, Feb. 1992.

15 - CAMARGO, J. L.; OLIVEIRA, M. L. C. S.; ROCHA, N. S. , NOBUYUKITO A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. **Rev Bras Cancer**, Rio de Janeiro, v. 40, n.1, p. 21-30, 1994.

16 - CANTONI, O; MURRAY, D.; MEYN, R. E. Effect of 3-aminobenzamide on DNA strand-break rejoining and cytotoxicity in CHO cells treated with hydrogen peroxide. **Bioch Bioph Acta**, Elsevier, 867, p. 135-143, 1986.

17 - CARLSSON, J. Salivary peroxidases: an important part of our defense against oxygen toxicity. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.16, p. 412-6, July.1987.

18 - CHERRY, D. V.; BOWERS, D.E.; THOMAS, L. Acute Toxicological effects of Ingested tooth whitners in Female rats. **J Dent Res**, Chicago, v. 72, n. 9, p. 1298-1303, Sept. 1993.

19 - CHRISTENSEN, G. J. To Bleach or not to bleach? **J Amer Dent Ass**, v. 122, p. 64-65, Dec. 1991.

20 - COSTA, A. L. L.; MESQUITA R. A.; TODDAI. E.; BRANDÃO, A. A. H. Otimização da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR em carcinoma bucal. **RPG**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 302, dez. 1996.

21 - COSTA, A L. L. **Dupla marcação PCNA /AgNOR e Ki 67 / AgNOR em carcinoma epidermóide de boca**. 1997. 84 f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

22 - COSTA FILHO, L. C.; COSTA, C. C.; SÓRIA, M. L.; TAGA, R. Effect of home bleaching and smoking on marginal gingival epithelium proliferation: a histologic study in women. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 31, p. 473-80, 2002.

23 - CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **J Pathol**, Edinburg, v. 151, n. 2, p.11-18, Feb. 1987.

24 - CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, Edinburgh, v. 158, n. 3, p. 185-188, July 1989.

25 - DARNELL, D. H.; MOORE, W. C. Vital tooth bleaching: The white and Brite technique. **Compend Contin Educ Dent**, Lawrencenille, v. 11, n. 2, p. 86-94, 1990.

26 - CIMILLI, H.; PAMEIJER, C.H. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. **Am J Dent**, San Antonio, v. 14, n.2, P. 64-66, Apr. 2001.

27 - DELAHUNT, B.; BETHWAITE, P. B.; NACEY, J. N.; RIBAS, J. L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with tumour grade, mitotic index, and silverstining nucleolar organizer region numbers. **J Pathol**, Edinburgh, v.170, n. 4, p. 471-77, Aug. 1993.

28 - DERENZINI, M.; PESSION, A; TRERÉ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab Invest**, v. 68, n. 1, p. 137-140, July 1990.

29 - DERENZINI, M.; TRERÉ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumors pathology. **Virchows Arch B Cell Pathol**, v. 61, n. 1, p. 1-8, Mar., 1991.

30 - DISHMAN, M. V.; BAUGHAN, L. W. Vital tooth bleaching- home use review and evaluation. **Va Dent J**, Richmond, v. 69, n. 2, p. 12-21, Apr./June 1992.

31 - FASANARO, T. S. Bleaching teeth: history, chemicals, and methods used for common tooth discolorations. **J Esthet Dent**, Ontario, v. 4, n.3, p. 71-78, May/June 1992.

32 - FASSONI, A. A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo experimental em hamsters sírios dourados. **Rev FOB**, Bauru, v. 7, n. 4, p.285-291, out./dez. 1993.

33 - FIEDLER, R. S.; REICHT, R. B. Combined professional and home care nightguard bleaching of tetracycline-stained teeth. **Esthetic Dentistry**. p. 257-61, May/June 2000.

34 - FRAZIER, K.B.; HAYWOOD, V. B. Teaching Nightguard Bleaching and Other Tooth-Whitening Procedures in North American Dental Schools **J Dent Educ**, San Francisco, v. 65, n. 5, p. 357-64, May 2000.

35 - FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease - free radicals and tissue injury. **Lab Invest**, New York, v. 17, n. 5, p. 412-26, 1982.

36 - FREITAS, R. A. **AgNOR em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares – análise comparativa**. 1991. 76 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

37 - FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals, **Science**, Washington, v. 201, n. 8, p. 875-80, Sept. 1978.

38 - FUJITA, K.; TAKU, T.; SASAKI, M. Experimental production of lingual carcinomas in the hamsters by local application of 9, 10- Dimethyl-1,2-Benzanthracene. **J Dent Res**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 327-32, Mar./Apr. 1973a.

- 39 - FUJITA, K.; TAKU,T.; SASAKI,M. Experimental production of lingual carcinoma in hamsters: tumor characteristics and site of formation. **J Dent Res**, Chicago, v. 52, n. 6, p. 1176-85, Nov./Dec.1973b.
- 40 - FUJITA, S.; TAKAHASHI, H.; OKABE, H. Proliferative activity in normal salivary gland and pleomorphic adenoma. **Acta Pathol JPN**, Copenhagen, v. 48, n.8, p. 573-578, Oct. 1992.
- 41 - GAGE, T. W.; FRAZIER, L. W.; WRIGHT, J. M. Oral soft tissue response to topically applied peroxide tooth Whitener. **J Dent Res**, Chicago,v. 71, p. 585, 1992 (Resumo n. 5580).
- 42 - GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromossomes using silver staining. **Chromosoma**, Berlim,v. 53, n. 2, p. 37-50, Feb. 1975.
- 43 - GOLDSTEIN, G. R.; KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L. Bleaching: is it safe and effective? **J Prosth Dent**, St Louis, v. 69, p. 325-328, Mar. 1993.
- 44 - GIUSTI, G. V. Fatal poisoning with hydrogen peroxide. **Forensic Sci**, Lausanne, v. 2, p. 99-100, 1973.
- 45 - GUIMARÃES, S. A C. Neoplasias. In:_____. **Patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 316-412.
- 46 - HALL, P. A ; COATES, P.J. Assesment of cell proliferation in pathology – what next? **Histopathology**, Oxford, v. 26, p. 105-112, Feb. 1995.
- 47 - HARRIS,R. C. G. Environment and the origin of cancer. **Quintessence Int**, Carol Stream, n. 9, p. 77-82, Sept. 1973.

48 - HAYS, G. L. et al., Co-carcinogenesis and field cancerization: oral lesions offer first signs. **J Amer Dent Assoc**, Chicago, v. 126, p. 47-51, Jan. 1995.

49 - HAYWOOD, V. B.; HEYMANN, H. O Nighthguard vital bleaching. **Quintessence Int**, Carol Stream, v. 20, n. 3, p.173-6, Mar. 1989.

50 - HAYWOOD, V. B. History and effectiveness of current bleaching and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int**, v. 23, n. 7, p. 471-88, 1992.

51 - HAYWOOD, V. B. Historical development of whiteners: clinical safety and efficacy. **Dent Update**, London, v.24, p. 98-104, 1997.

52 - HERNANDEZ-VERDUN, D.; FAKAN, S. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biol Cell**, Ivry Sur Seine, v. 56, n. 3, p. 189-206, Aug. 1986.

53 - HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P. Cell biological basis of AgNOR staining. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, Berlin, v. 427, n.3, p.326-327, Nov. 1995.

54 - HIGGINSON, J. Environmental carcinogenesis. **Cancer**, New York, v. 72, n. 3, p. 971-7, Aug. 1993. Suplemento.

55 - HIROTA, N.; YOKOYAMA, T. Enhancing effect of hydrogen peroxide upon duodenal na upper jejunal carcinogenesis in rats. **Gann**, Tokyo, v. 72, p. 811-12, Oct. 1981.

56 - HOWARD, W. R. Patient-applied tooth whiteners are they safe, effective with supervision? **J Amer Dent Assoc**, Chicago, v. 123, n. 2, p. 57-60, Feb. 1992.

57 - HOWELL, W. M.; BLACK, D. A Controlled silver staining of nucleolar organiser regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, Aug.1980.

58 - HOFSTÄDTER, F.; KNÜCHEL, R.; RÜSCHOFF, J. Cell proliferation assessment in oncology. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, Berlin, v. 427, n. 3, p. 323-341, Nov. 1995.

59 - IMLAY, J. A ; LINN, S. DNA Damage and oxygen radical toxicity. **Science**, Washington, v. 240, n. 3, p. 1302-1309, Jun. 1988.

60 - ITO, A.; WATANABE, H. Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. **Gann**, Tokyo, v. 72, p. 174-175, Feb. 1981.

61 - ISQUIERDO, J. N. Inducción, crecimiento y conducta biológica de neoplasias orales experimentales. **Rev ALAFO**, Guatemala, v. 14, n. 2, p. 109-113, Jul. 1979.

62 - KAHN, M. A.; MINCER, H. H.; DOCKTER, M. E.; HERMANN-PETRIN, J. M. Comparison flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 257-262, July. 1993.

63 - LARSON, T. D. The effect of peroxides on teeth and tissue review of the literature. **Northwest Dent**, St Paul, v. 41, n.4, p. 29-32, Nov./Dec. 1990.

64 - LAM, K. Y; LAW, S.Y.-K; SO, M. K-P.; FOK, M.; L. T.; WONG, J. Prognostic implication of proliferative markers MIB1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, New York, v.77, p. 7-13, Jan. 1996.

- 65 - LEONARD, R. H.; EAGLE, J. C.; GARLAND, G. E.; MATHEWS, K. P.; RUDD, A. L.; PHILIIPS, C. Nightguard vital Bleaching and its effect on enamel surface morphology. **J Esthet Rest Dent**, Hamilton, v. 13, n. 2, p. 132-139, 2001.
- 66 - LEVINE, A J.; PERRY, M. E.; CHANG, P.; SILVER, A; DITTEMER, D. The role of the p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, London, v.69, n. 3, p. 409-16, Mar.1994.
- 67 - MAGALHÃES, M. H. C. G. **Utilização da técnica do AgNOR em patologia óssea**. 1994. 64f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 68 - MAGALHÃES, M. H. C. G.; ARAÚJO, N. S. Utilização da técnica do AgNOR em neoplasias ósseas dos maxilares. **RGP**, São Paulo, v.3, n.1, p.53-58, Jan./Mar. 1996.
- 69 - MAREFAT, M. P. The effect of the short dose schedule of DMBA application in inducing lingual neoplasia in inbred Syrian hamster. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.14, n. 5, p. 383-389, 1985.
- 70 - MAREFAT, P.; SHKLAR, G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. **Oral Surg**, St Louis, v. 44, n. 4, p. 578-586, Oct. 1977.
- 71 - MATOLCSY, A ; NÁDOR. R.; WÉBER, E. KÓNYA, T. Nucleolar organizer regions of megakaryocytes in chronic myeloproliferative disorders. **Virchows Archiv A Pathol Anat**, Berlin, v. 420, n. 23, p. 441-445, June. 1992.
- 72 - MENDONÇA, G. A e S. Câncer no Brasil: um risco crescente. **Rev Bras Cancer**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 167-76, 1992.

73 - MESQUITA, R. A. **Fibroma ossificante periférico e fibroma ossificante: estudo clínico, histopatológico e da proliferação celular.**

1996, 84 f. - Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

74 - MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis **Cancer**, New York, v. 47, n. 5, p. 1055-1064, March. 1981.

75 - MILLER, E. C.; Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experiment animals: presidential address. **Cancer Res**, Chicago, v. 38, p. 1479-1496, June 1978.

76 - NELSON, N. Cancer prevention: environmental, industrial and occupational factors **Cancer**, New York, v. 47, n. 5, p. 1065-1070, March. 1981.

77 - NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M. Patologia epitelial In_____ **Patologia oral & maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 253-313.

78 - NUNES, F. D.; PINTO Jr., D. S.; ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO, V. C. Estudo morfológico de otimização da técnica do AgNOR. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DA PESQUISA ODONTOLÓGICA, 6. 1990, Pirassununga. **Anais**. São Paulo: SBPQO, p. 31. 1990

79 - ODUKOYA, O; SHKLAR, G. Initiation and promotion and experimental oral carcinogenesis. **Oral Surg**, St Louis, v. 58, n. 3, p. 315-320, Sept. 1984.

80 - ODUKOYA, O; SHKLAR, G. Two-phase carcinogenesis in hamster buccal pouch. **Oral Surg**, Stl Louis, v. 54, n. 5, p. 547-52, Nov. 1982.

- 81 - PIEROLI, D. A.; NAVARRO, M. F. de L. Clareação de dentes vitalizados: considerações gerais. **Rev ABO Nac**, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 244-248, Ago./Set. 1996.
- 82 - PIEROLI, D. A **Avaliação do potencial carcinogênico dos agentes clareadores dentais**. 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- 83 - PIEROLI, D. A; NAVARRO, M. F. L.; CONSOLARO, A. Evaluation of the carcinogenic potential of bleaching agents in a DMBA induction-model. **Oral Med Pathol**, Japan, 5:29-34, 2000.
- 84 - POWELL, L. V., BALES, D. J. Tooth bleaching: its effect on oral tissues. **J Amer Dent Assoc**, Chicago, v. 122, n. 11, p. 50-54, Nov.1991.
- 85 - POWERS, J. M.; FARAH, J. L. W. Produtos clareadores fluoretos. **The Dental Advisor**, Dois Córregos, v. 4, n. 1, p.2-8, 1996.
- 86 - PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J. J. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochem J**, London, v. 18, n. 1, p. 5-14, Jan. 1986.
- 87 - PRICE, R. B. T.; SEDAROUS, M.; HILTZ, G. S. The pH of tooth-whitening Products. **J Can Dent Assoc** , Ottawa, v. 66, n. 8, p. 421-6, 2000.
- 88 - RABENHORST, S. H.; BURINI, R. C.; SCHMITT, F. C. L. Marcadores de proliferação celular. **Rev Bras Patol Clin** , Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 24-29, Jan./Mar. 1993.

89 - REES, T. D., ORTH, C. Oral ulcerations with use of hydrogen peroxide. **J Periodontol**, v. 57, n. 11, p. 689-92, Nov. 1986.

90 - RODRIGUES, M. A. M.; CAMARGO, J. L. V. Carcinogênese. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 3ª ed, São Paulo: Editora Ateneu, p.193-203. 1992.

91 - ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Neoplasia In:_____. **Pathologic basis of disease**. 4ª ed. Filadélfia: Saunders, 1989. p. 239-305.

92 - ROSA, J.; MEHTA, A ; FILIPE, M. I. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. **Histopathology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 265-9, Apr. 1990.

93 - RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. Rio de Janeiro, Interlivros, 1990.

94 - SALTZ, E. Projeto de expansão da prevenção e controle do câncer de boca – Quinquênio 1988-93. **Rev Bras Cancer**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 221-239, 1988.

95 - SALLEY, J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. **J Dent Res**, Chicago, v. 33, n. 2, p. 253-262, Apr. 1954.

96 - SALLEY, J.J. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. **J Dent Res**, Chicago, v. 36, n. 1, p. 48-55, Feb. 1957.

97 - SANO, K.; TAKANASHI, H.; FUJITA, S.; INOKUCHI, T.; PE, M. B. Prognostic implication of silver bending nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 53-56, Feb. 1991.

98 - SIMONSEN, R. J. Home bleaching - is there scientific support?

Quintessence Int, Carol Stream, v. 21, n. 12, p. 931, 1990.

99 - SILVERMAN, M. A. Early diagnosis of oral cancer. **Cancer**, New York, v. 62, p. 1796-1799, Oct. 1988.

100 - SPORN, M. B. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. **Cancer Res**, Chicago, v. 51, p. 6215-6218, Dec. 1991.

101 - STRASSLER, H. E.; SCHERER, W.; CALAMIA, J. R. Carbamide peroxide at-home bleaching agents **N Y St Dent J**, New York, v. 58, n. 4, p. 30-35, Apr. 1992.

102 - SHKLAR, G. The effect of manipulation and incision on experimental carcinoma of hamster buccal pouch. **Cancer Res**, Chicago, v. 28, p. 2180-2182, Nov. 1968.

103 - SHAW, M. W. Human chromossome damage by chemical agents. **Ann Rev Med**, Palo Alto, v.21, p. 409-432, 1970.

104 - SHWINT, A; MORALES, A; CABRINI, R. L.; ITOIZ, M. E. AgNOR mark epithelial face in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v .25, n.1, p. 20-24, Jan. 1996.

105 - TAM, L. Vital tooth bleaching: review and current status. **J Canad Dent Assoc**, Ottawa, v. 58, n. 8, p. 654-663, Aug. 1992.

106 - TAM, L. The safety of home bleaching techniques. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 65, n. 8, p. 453-455, 1999.

107 - TAM, L. Effect of potassium nitrate and fluoride on carbamide peroxide bleaching., **Quintessence Int, Carol Stream**, v. 32, n. 10, p. 766-770, Oct. 2001.

108 - WALKER, R. A. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. **Histopathology**, Oxford, v. 12, n. 3, p.221-223, Apr.1988.

109 - WANDERA, A., Home-use tooth bleaching agents: in vitro study on quantitative effects on enamel, dentin and cementum. **Quintessence Int, Carol Stream**, v. 25, n. 8, p. 541-546, Aug.1994.

110 - WEITZMAN, S. A.; WEITBERG AB.; NIEDERMAN, R. Chronic treatment with hydrogen peroxide: Is it Safe? **J Periodontol**, Birmingham, v. 55, n.9, p. 510-511, 1984.

111 - WEITZMAN, S. A.; WEITBERG AB.; STOSSEL T. P. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. **J Periodontol**, Birmingham, v. 57, p. 685-8, Nov. 1986.

112 - YANG, P.; HUANG, G. S.; HU, X. S. Role of nucleolar organizer regions in differentiating malignant from benign tumors of the colon. **J Oral Pathol**, Edinburgh, v. 43, n. 3, p. 235-238, Mar. 1990.

113 - YOSHIMI, N.; GIMENEZ-CONTI, I. B.; SLAGA, T. J. Morphological changes of the nucleolar organizer regions induced by 7-12dimethylbenz[a]anthracene in the hamster cheek pouch. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 22, n.3, p.97-100, Mar.1993.

114 - ZACZEK, M.; DABROS E.; MACIEJOWSKI, J.; SZOT, W. Identification and assessment of nucleolar organizer regions (NORs) – technical problems. **Pathol Pol**, v.45, n. 1, p. 35-38, 1994.

SUMMARY

QUANTITATIVE ANALYSIS OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS (NORS) IN SQUAMOUS CELLS CARCINOMAS DEVELOPED IN DMBA INDUCTION-MODEL WITH BLEACHING AGENTS

Oral squamous cell carcinoma is the mouth most prevalent malignancy, accounting for more than 90% of all oral malignancies. It is also known that the development of oral cancer has a strong relationship with chemical and physical action of some agents that are in daily contact with oral mucosa as drugs, food, alcohol, tobacco and environmental factors. Oral carcinogenesis has a cumulative effect upon cells, every substance with potential risk of evidencing this malignant process should be evaluated. The concern is about carcinogenic potential of these chemical bleaching agents in the proliferation cells. The bleaching agents containing 10% carbamide peroxide are often used for vital teeth home bleaching and there is the risk of tissue damage from ingestion of the substance and contact with the oral mucosa during the bleaching process. The current study involves the evaluation of the cell proliferation and squamous cell carcinomas development in DMBA induction-model + 10% carbamide peroxide using biologic markers in the detection of incipient cellular alterations with histochemical method AgNOR, to investigate the relationship between the number of interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs). The numbers of the NORs can be related to proliferative activity and the degree of the developed malignancy tumours.

The quantitative analysis of the number of the NORs in the group I (acetone), II (Opalescence), III (White & Brite) and VII (destiled water) showed no cells proliferation compatible with neoplastic alterations. The occurrence of the number per nucleus was less than in the others groups. The groups IV (carcinogen DMBA), V (DMBA + 10% carbamide peroxide - Opalescence), VI (DMBA + 10% carbamide peroxide - White & Brite) showed the development micro-invasive and invasive carcinomas. The occurrence of the number of the NORs/nucleus was greater in those three groups than in the groups without carcinomas. The groups V (DMBA + Opalescence) and VI (DMBA + White & Brite) developed a greater of the occurrence of the number of the NORs per nucleus than in the group IV (DMBA). In the groups V and VI with developed invasive carcinomas showed growth cells proliferation and increase in the rate of the malignancy in the squamous cells carcinomas developed. This showed an cell proliferation of the groups (DMBA + 10% carbamide peroxide) is more intensive than in the group IV, probably by promoter effect of the bleaching agents. It was concluded that the bleaching agents based on 10% carbamide peroxide used in this study model, has a enhance promoter action, with capacity for carcinogens pottentialy and developed neoplastic alterations.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte e comunicada, ao autor, a referência em que consta a citação.

Dayse Aparecida Pieroli

Assinatura

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Departamento: Dentística e Endodontia

Local e data: São Paulo, ____/____/2003

E mail: daysepieroli@zaz.com.br