

ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE *Candida albicans*  
E DA SIALOADENECTOMIA NO CARCINOMA BUCAL  
DE RATOS TRATADOS COM 4-NQO

Este exemplar foi  
divididamente corrigido, conforme  
Resolução CCPG/036/83 -  
Piracicaba, 10 de fevereiro de 1995.

Tese apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Biologia e  
Patologia Buco-Dental, Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, Universidade  
de Campinas para a obtenção do  
Título de Mestre em Ciências.

  
Dr. Odeir Peres de Almeida  
Prof. Titular de Patologia  
UNESP - PIRACICABA

PIRACICABA - S.P.

\*1995\*

**ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS**

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE *Candida albicans*  
E DA SIALOADENECTOMIA NO CARCINOMA BUCAL  
DE RATOS TRATADOS COM 4-NQO**

**Tese apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Biologia e Patologia  
Buco-Dental, Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba, Universidade de Campinas  
para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA**

**PIRACICABA - S.P.**

**\*1995\***



Este trabalho é dedicado

Aos meus pais PAULO e REGINA e aos meus irmãos MARGARETH, PAULO, ROBERTO e ELAINE, que mesmo distantes estão sempre comigo: O carinho de vocês e a presença nos bons e "não tão bons momentos" foi sempre uma força extra indispensável durante toda a minha vida.

A RITA, ALEXANDRE, CIDA, JOÃO e JOSÉ ROBERTO pelo constante estímulo, e imenso carinho que sempre me deram.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, por quem a convivência só fez aumentar o respeito e a admiração. Por tudo que seu exemplo como professor, pesquisador e sobretudo ser humano representa para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pelo exemplo profissional e pessoal e pela amizade e confiança em mim depositados.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que nos permitiu realizar o curso de Pós-Graduação.

Aos amigos e professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por terem me recebido com amizade e pela grande boa vontade em ajudar sempre que necessário.

Aos professores, alunos e amigos do curso de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado) em Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Às Sras. ANA CRISTINA AMARAL GODOY e MARIA HELENA VASCONCELOS PERON, técnicas de laboratório da disciplina de Patologia, pela ajuda indispensável durante a confecção deste trabalho; pela paciência e boa vontade com que me ensinaram as técnicas utilizadas neste trabalho; e sobretudo, pela amizade sincera cultivada durante estes anos.

À aluna de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental MARILDA APARECIDA GONÇALVES TOTTI pelo auxílio durante a fase experimental e sobretudo pelo companheirismo e amizade.

Ao técnico de laboratório ADRIANO L. MARTINS pela ajuda no tratamento dos animais.

Aos amigos PEDRO DUARTE NOVAES, VANESSA MONTEIRO PEDRO e CLÁUDIA MARIA NAVARRO, pela grande amizade que cultivamos e que sempre me deu forças para continuar a caminhada.

Aos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, VERA FANTINATO, MÁRIO TSUNEZI SHIMIZU, CARMELINDA SHIMIDT UNTERKIRSHER e NEIDE QUERIDO ALMEIDA, pelo incentivo, confiança e amizade que sempre recebi.

Ao LUIZ HENRIQUE, EMÍLIO e MARCO do Centro de Processamento de Dados (CPD) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela paciência e indispensável auxílio durante o processo de digitação deste trabalho.

Nossos agradecimentos a todos que de um modo contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO .....	02
REVISÃO DA LITERATURA.....	04
1 CÂNCER BUCAL.....	04
2 CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL.....	04
2.1 Óxido de Nitroquinolina.....	10
3 CANDIDOSE BUCAL.....	15
3.1 <b>Candida albicans</b> .....	17
- Características gerais.....	17
- Patogenicidade.....	19
4 FATORES PREDISPOONENTES À CANDIDOSE.....	21
5 PRESENÇA DE <b>C.albicans</b> EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E MALIGNAS DA CAVIDADE BUCAL.....	22
6 CANDIDOSE BUCAL EXPERIMENTAL.....	25
7 XEROSTOMIA.....	27
PROPOSIÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1 ANIMAIS.....	35
2 SIALOADENECTOMIA.....	35
3 PRESENÇA DE <b>C. albicans</b> NA BOCA DE RATOS.....	36
4 INOCULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE <b>C. albicans</b> DA CAVIDADE BUCAL DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS... 36	
4.1 Inoculação de <b>C. albicans</b> .....	37
4.2 Recuperação de <b>C. albicans</b> .....	37
5 APLICAÇÃO DO 4-NQO.....	38
6 OBSERVAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS.....	38



7 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	39
7.1 INOCULAÇÃO DE <b>C. albicans</b> .....	39
7.2 APLICAÇÃO DE 4-NQO POR 5 MESES, SEGUIDA DE <b>C. albicans</b> POR 3 DIAS CONSECUTIVOS.....	40
7.3 FORMAÇÃO DE CARCINOMAS.....	40
RESULTADOS.....	44
1 RECUPERAÇÃO DE <b>C. albicans</b> E CANDIDOSE APÓS INOCULAÇÃO DURANTE 3 DIAS.....	44
1.1 Recuperação de <b>C. albicans</b> .....	44
1.2 Candidose.....	44
2 APLICAÇÃO DE 4-NQO POR 5 MESES, SEGUIDO DE 3 INOCULAÇÕES CONSECUTIVAS DE <b>C. albicans</b> .....	45
2.1 Recuperação de <b>C. albicans</b> .....	45
2.2 Candidose.....	46
2.3 Morfologia.....	46
3 FORMAÇÃO DE CARCINOMAS.....	47
3.1 Peso Corporal.....	48
3.2 Período de desenvolvimento de carcinomas.....	49
3.3 Distribuição de carcinomas na cavidade bucal.....	49
3.4 Recuperação de <b>C. albicans</b> .....	56
3.5 Candidose.....	57
4 ESTÔMAGO.....	59
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	75
RESUMO.....	77
SUMMARY.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

As principais causas do carcinoma bucal são o tabaco e o álcool (BRUGERE e cols., 1986; FRANCO e cols., 1989; MAIER, 1992). A participação da saliva e de infecções, particularmente por *C. albicans* no desenvolvimento de carcinoma bucal é controversa. A hipossalivação favorece o desenvolvimento de cárie dental, assim como a colonização e permanência de *C. albicans* na cavidade bucal (JORGE e cols, 1993a e b; TOTTI, 1994). Ratos com o fluxo salivar diminuído pela metilescopolamina desenvolveram carcinomas bucais mais precocemente quando tratados pelo dimetilbenzantraceno (WALLENIS, 1966). Ratos sialoadenectomizados desenvolveram lesões mais severas e em maior número após aplicação do óxido de nitroquinolina (NAVARRO, 1992).

Leucoplasias e carcinomas bucais podem apresentar infecção por *C. albicans*, mas o seu papel no desenvolvimento destas lesões não é conhecido (CAWSON, 1966; CAWSON e LEHNER, 1968; RENSTRUP, 1970; KROGH e cols., 1987). Há sugestões de que biotipos de *C. albicans*, produtores de nitrosaminas endógenas estejam implicados na evolução de carcinomas bucais (HSIA e cols., 1981; KROGH e cols, 1990). Não há dados na literatura descrevendo a associação de infecção por *C. albicans* com lesões bucais causadas pelo 4-NQO.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da aplicação de *C. albicans* e da sialoadenectomia no desenvolvimento de carcinomas bucais em ratos.

**REVISÃO DA LITERATURA**

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 CÂNCER BUCAL

O câncer bucal está entre as dez neoplasias mais comuns no homem. Ocorre predominantemente em indivíduos do sexo masculino e após os 40 anos de idade. Cerca de 75% dos casos são diagnosticados em indivíduos com cerca de 60 anos (BOYLE e cols., 1990; THOMAS e FAECHER, 1992).

Os carcinomas de células escamosas representam 90 a 95% das neoplasias malignas de boca; atingindo principalmente o lábio inferior e a língua (PINDBORG, 1980). Na língua, cerca de 45% dos casos ocorrem na borda lateral posterior. O aspecto clínico característico é de uma massa tecidual exofítica endurecida e de bordas elevadas, com superfície irregular e ulceração frequente. Apresenta alto potencial metastático devido à rica drenagem linfática local.

Os carcinomas de lábio representam 25 a 30% de todos os cânceres de boca, ocorrendo numa frequência 20 vezes maior no lábio inferior em relação ao superior. Apresenta comportamento biológico e etiologia diferentes das lesões intrabucais (BOYLE e cols., 1990). O aspecto clínico do câncer de lábio varia de acordo com a duração da lesão e do tipo de crescimento neoplásico. O terço médio da semimucosa labial parece ser o ponto de início mais frequente. Clinicamente pode apresentar-se desde um tumor exofítico sobre um processo ulcerativo, até uma tumefação pouco elevada do vermelhão do lábio, muitas vezes formando lesão crostosa. O câncer de lábio raramente provoca metástases (PINDBORG, 1980).

O padrão histológico do carcinoma de células escamosas é a presença de ninhos, cordões ou grupos de células epiteliais malignas que infiltram o tecido conjuntivo

subjacente. As células neoplásicas exibem pleomorfismo, hipercromatismo e mitoses atípicas. Algumas são bem diferenciadas, lembrando as células de origem; outras menos diferenciadas.

O grau de diferenciação dos carcinomas é estimado pela formação de queratina pelas células neoplásicas, originando as pérolas córneas. O carcinoma é considerado bem diferenciado quando ocorre intensa formação de pérolas córneas. Considera-se que quanto menos diferenciada for a lesão, pior é o prognóstico; entretanto outros fatores como localização e estadiamento clínico são relevantes para o prognóstico. A ocorrência de metástases regionais depende do grau de diferenciação, localização e estadiamento clínico da lesão. (TOMMASI, 1989).

A incidência de câncer bucal é muito alta em alguns países como a Índia, Paquistão e Sri Lanka. No sudeste da Ásia representa cerca de 40 a 50% de todas as neoplasias malignas. Em países ocidentais o índice de ocorrência é de 3 a 5%. Na França, o índice de mortalidade é de 9,5 mortes por 100.000 habitantes (WINDER e cols., 1957; PINDBORG, 1980). No Brasil, o câncer de boca constitui a 3ª neoplasia mais comum no homem e a 7ª entre as mulheres. Segundo levantamento feito pelo Instituto Nacional do Câncer em 1991, a incidência de câncer bucal no Brasil foi de 14% entre as neoplasias malignas.

Vários fatores são relacionados à etiologia do câncer bucal (HAMADA, 1991). O fumo e o álcool são considerados os principais responsáveis pela alta incidência de carcinomas bucais (WEAVER e cols., 1979; PINDBORG, 1980; DREIZEN e LEVY, 1981; MASHBERG e cols., 1981; BOYD e READE, 1988; SCULLY e cols., 1992).

Estudos epidemiológicos relacionam hábitos culturais de determinadas regiões, como fumar com a extremidade do cigarro acesa no interior da boca, mascar fumo ou cheirar rapé, à alta incidência de carcinoma de células escamosas na boca (COHEN e cols., 1971; SANKARANARAYANAN e cols., 1989; BOYLE e cols., 1990). WINDER e cols. (1957) observaram, em estudo realizado nos Estados Unidos, que indivíduos fumantes apresentavam risco três vezes maior de desenvolver câncer de boca que indivíduos não

fumantes. Resultados semelhantes foram encontrados em Porto Rico, onde os fumantes apresentaram risco até cinco vezes maior (MARTÍNEZ, 1969). Em regiões metropolitanas do Brasil, fumantes de cigarro apresentam risco 6,5 vezes maior de desenvolverem câncer bucal que indivíduos que nunca fumaram (FRANCO e cols., 1989). MAIER (1992) analisou 200 pacientes portadores de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço e observou que apenas 4,5% dos pacientes nunca haviam fumado. Existe forte relação entre o número de cigarros consumidos e o desenvolvimento do câncer bucal. Indivíduos que fumam mais de um maço de cigarros por dia ou cinco ou mais cachimbos ou charutos por dia apresentam um risco seis vezes maior que indivíduos não fumantes (GRAHAM e cols., 1977).

A redução e/ou eliminação dos fatores de risco é de grande relevância na prevenção do câncer bucal. MOORE (1965) estudou um grupo de 102 pacientes tratados de câncer de boca ou garganta. Dos 65 pacientes que continuaram com o hábito após o tratamento, 21 desenvolveram um segundo câncer no mesmo sítio após 6 anos; enquanto dos 37 que abandonaram o hábito, apenas 2 desenvolveram um segundo câncer no mesmo período de tempo. O risco entre ex-fumantes e indivíduos que nunca fumaram de desenvolver câncer bucal só é semelhante após 10 anos de abandono do hábito (FRANCO e cols., 1989; BOYLE e cols., 1990).

Na grande maioria dos indivíduos portadores de câncer de boca, o hábito misto do fumo e ingestão de bebidas alcoólicas é prevalente, ocorrendo sinergismo entre esses dois fatores, elevando significativamente a probabilidade de desenvolvimento de câncer bucal (HIRAYAMA, 1966; BROSS e COOMBS, 1976; WEAVER e cols., 1979; BRUGERE e cols., 1986; BLOT e cols., 1988; MERLETTI e cols., 1989). Segundo MAIER(1992) a combinação do consumo do álcool e tabaco aumenta os riscos de modo multiplicativo. Esses autores ressaltaram ainda a forte relação entre o número de doses ingeridas e o desenvolvimento de câncer bucal; fator relatado também por outros autores (WINDER e cols., 1957; BURGERE e cols., 1986).

O consumo de álcool é o responsável pelo alto índice de mortalidade por câncer de boca, faringe e laringe em indivíduos do sexo masculino com menos de 55 anos, em algumas regiões da França, onde as famílias cultivam o hábito social de ingerir bebida alcoólica diariamente (BRUGERE e cols., 1986). No Brasil, a alta incidência de carcinoma de língua também está relacionada ao tabagismo e consumo de cachaça (FRANCO e cols., 1989).

Na produção do câncer bucal, o álcool pode agir de modo direto na mucosa, através do efeito local de seus componentes químicos, como substâncias aromáticas, alcalóides, e hidrocarbonetos policíclicos; ou de modo indireto, por via sistêmica, tornando a mucosa bucal mais susceptível à ação dos agentes carcinogênicos ou co-carcinogênicos (KOCK, 1977; TETU, e cols., 1977). O efeito local do álcool sobre a mucosa bucal também é relatado em pacientes que não fumavam ou ingeriam bebidas alcoólicas, porém faziam uso de soluções de bochecho, cujo teor alcoólico varia entre 14 e 28%, sendo igual ou superior aos encontrados em bebidas alcoólicas (WEAVER e cols., 1979; BLOT, 1983).

Dentre as patologias sistêmicas, a cirrose hepática é relacionada ao desenvolvimento de câncer bucal, devido à deficiência nutricional e carências vitamínicas geradas por distúrbios metabólicos (KELLER, 1969; KOCH; 1977 PALMER, 1978; TOMMASI, 1989). Grande evidência da relação entre deficiências nutricionais e câncer bucal é encontrada na síndrome de Plummer-Vinson devido à carência de ferro. A deficiência em ferro exerce influência sobre o epitélio bucal, produzindo atrofia e alterações na cinética celular (WINDER, 1957; RENNIE e cols., 1984; LA VECHIA e cols., 1991).

O excesso ou deficiência vitamínica pode afetar o metabolismo e ativação específica dos carcinógenos, influenciando no desenvolvimento do carcinoma bucal. A vitamina C é capaz de inibir a nitrosilação de aminas secundárias, evitando a consequente formação de nitrosaminas; o consumo frequente de frutas cítricas e de alimentos ricos em caroteno, como a cenoura, abóbora e mamão foram associados à redução significativa do risco de câncer (WINN e cols., 1984; BOYD e READE, 1988; MCLAUGHLIN e cols., 1988; FRANCO e cols., 1989; BOYLE e cols., 1990; STICH e cols., 1991).



Fatores ocupacionais e desenvolvimento de câncer de lábio têm sido correlacionados em indivíduos que ficam expostos à luz solar por longos períodos, como pescadores, agricultores, fazendeiros e marinheiros (SPITZER e cols., 1975; PORTUGAL e MARTINS, 1982). Entre trabalhadores de indústrias têxteis, VOGLER e cols. (1962) verificaram que o câncer de boca era 3 vezes mais comum que o câncer de outra região. Resultados semelhantes foram encontrados na Inglaterra, sendo que os trabalhadores de indústrias têxteis de algodão eram mais susceptíveis (BINNIE e cols., 1972; MOSS e LEE, 1974). A exposição a metais, óleo, graxa e outras substâncias estão envolvidos no desenvolvimento de carcinomas em vários sítios do trato digestivo (CAUVIN e cols., 1990).

Outros fatores implicados na etiologia do câncer bucal, como higiene bucal precária, traumatismos por prótese mal adaptada, arestas dentais ou restaurações inadequadas são questionáveis (PINDBORG, 1980; FRANCO e cols., 1989).

## **2 CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL**

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, a partir do qual uma célula normal passa a adquirir progressivamente potencialidades de imortalização, geração de tumores e finalmente capacidade de invadir tecidos normais e colonizar órgãos à distância (CHAMMAS e VILLA, 1993).

O processo de carcinogênese é dividido em duas fases distintas: iniciação e promoção. Iniciação resulta em alterações irreversíveis no DNA celular. Nesse estágio, células normais são convertidas em células tumorais latentes. No estágio promotor, as células iniciadas expressam significativamente seu fenótipo aberrante, deixando seu estado de latência e passando para um estado de proliferação progressiva (BERENBLUM e cols., 1970; BECKER, 1981; ODUKOYA e SHKLAR, 1984).

Em 1927, BONNE estudando o desenvolvimento de carcinomas na pele de camundongos induzidos pela aplicação de alcatrão, observou que esses animais desenvolviam papilomas na boca e estômago, provavelmente devido à ingestão do produto ao lambar a região. Após estas observações, o tabaco e os produtos de sua combustão passaram a ser amplamente utilizados na carcinogênese bucal experimental (ROFFO, 1930; OYAMA, 1935; KRESHOVER, 1957).

Há diferenças de susceptibilidade entre as espécies animais aos diferentes agentes carcinogênicos. SALLEY (1954) estudou os efeitos da aplicação de hidrocarbonetos policíclicos sobre o epitélio da bolsa da bochecha de hamsters. Animais que receberam aplicação de 9,10 dimetil- 1,2 benzantraceno (DMBA) por 16 semanas apresentaram os primeiros carcinomas após sete semanas de tratamento. Durante a aplicação do DMBA, o epitélio passou por alterações progressivas que consistiram de hiperplasia, papilomas, carcinoma "in situ" e carcinoma de células escamosas. DMBA é um hidrocarboneto aromático que atravessa a membrana celular e age nos cromossomas durante a intérfase (WALLENIOUS e cols., 1975). Embora esse modelo continue sendo amplamente utilizado, DMBA não apresenta a mesma eficácia em outras espécies animais (FUJITA e cols., 1973; YAMAMURA e cols., 1975; MAREFAT e cols., 1979; HASSAN e cols., 1985; MULLER e cols., 1985; PERRIN e cols., 1990).

O modelo proposto por WALLENIOUS e LEKHOLM em 1973 é o mais utilizado. O carcinógeno óxido de nitroquinolina (4-NQO) é aplicado no palato de ratos três vezes por semana, resultando no desenvolvimento de carcinomas de palato e de língua em 100% dos animais num período de 7 meses (WONG e WILSON, 1983; OHNE e cols., 1981, 1985; PRIME e cols., 1986; FISKE e cols., 1987, 1990).

## 2.1 ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4-NQO)

O óxido de nitroquinolina (4-NQO) é uma amina aromática hidrossolúvel que foi sintetizada por OCHIAI e cols., em 1954. O 4-NQO ao ser metabolizado pelo organismo torna-se um carcinógeno potente que liga-se covalentemente ao DNA, causando mutações responsáveis pela transformação da célula normal em neoplásica (BOYD e READE, 1988; STITE e cols., 1987).

Enzimas tipo hidrolases convertem o 4-nitroquinolina 1-óxido em 4-aminoquinolina 1-óxido e 4-hidroxiquinolina. Esses derivados do 4-NQO induzem mutações em bases nitrogenadas, deleções, conversões genéticas e aberrações crossômicas tais como alongamentos e deformações, além de quebra e troca de cromatina (SINGER e GRUNDBERGER, 1983; BOYD e READE, 1988; NAGAO e SUGIMURA, 1986).

Através de estudos das alterações celulares que ocorrem durante o processo de carcinogênese verificou-se que o 4-NQO age nos cromossomas na prófase, após o rompimento da membrana nuclear (WALLENUS e cols., 1975). 4-NQO na concentração de 0,001% diminui a viabilidade das células de sarcoma de camundongos; e a 0,002% exerce efeito letal. Inibe o crescimento de tumor de Ehrlich na forma ascítica e na forma sólida "in vivo". Tem ação fungicida para *Aspergillus niger*, *Trichophyton asteroides* e *Candida albicans* (SAKAY, 1957). O 4-NQO é utilizado para imortalização de células humanas "in vitro" para se estudar os mecanismos envolvidos nos estágios da carcinogênese (BAI e cols., 1993).

NAKAHARA e cols. (1957) foram os primeiros a demonstrarem a ação carcinogênica do óxido de nitroquinolina, através da aplicação do 4-NQO a 0,25% em benzeno três vezes por semana na pele de camundongos. Papilomas desenvolveram-se em 100% dos animais após 100 dias e neoplasias malignas após 200 dias de tratamento.

A mucosa bucal é considerada por muitos autores como sendo mais resistente à carcinógenos químicos do que a pele. A dificuldade em se induzir experimentalmente

carcinomas na cavidade bucal através de carcinógenos químicos está relacionada com a falta de "portões de entrada" para o carcinógeno, como folículos pilosos, e glândulas sebáceas, além do efeito protetor exercido pela saliva. Em animais que foram pincelados com 4-NQO na orelha após aplicação de uma camada de saliva, o período de latência para o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares foi 30 vezes maior quando comparado com animais que não receberam aplicação prévia de saliva (WALLENIOUS e LEKHOLM, 1973). A ação protetora exercida pela saliva, segundo WALLENIOUS e LEKHOLM (1973) é devida à ação mecânica da saliva na eliminação do agente carcinogênico. Esses autores acrescentaram ainda que o uso de um carcinógeno hidrossolúvel é mais importante para que ocorra o desenvolvimento de neoplasias na boca do que qualquer resistência que possa ser oferecida pelo tecido.

A aplicação de 4-NQO a 0,5% em propilenoglicol no palato de ratos com fluxo salivar intacto resultou no desenvolvimento de carcinomas de palato em 100% dos animais num período de 7 meses. Carcinomas de língua, mandíbula e estômago ocorreram em 75, 20 e 30% dos animais respectivamente (WALLENIOUS e LEKHOLM, 1973).

A incidência de carcinomas de palato e língua em ratos cuja xerostomia permanente foi conseguida pela remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, que foram pincelados com 4-NQO no palato 4 vezes por semana por um período de 6 meses foi 47,75% e 15,8% maior que nos animais com fluxo salivar intacto sob o mesmo tratamento. O número de animais sialoadenectomizados com carcinoma de palato foi 18,0% e de língua 36,4% maior em relação aos normais (NAVARRO, 1992).

A diferença de susceptibilidade entre as espécies animais e entre raças da mesma espécie aos carcinógenos químicos é relevante na eficácia do agente em produzir neoplasias malignas. A língua de hamster é relativamente refratária à ação do 4-NQO. Primatas são muito resistentes à ação de carcinógenos químicos comumente utilizados (COHEN e SMITH, 1967; KITANO e cols., 1992). A susceptibilidade de 7 espécies de rato à ação carcinogênica do 4-NQO foi estudada através da administração de 4-NQO a 0,001% na água de beber. Os animais receberam 4-NQO desde a idade de 6 meses até apresentarem

estado geral de caquexia. Todos os animais desenvolveram carcinomas de células escamosas em vários sítios da cavidade bucal e trato digestivo. A raça Dark-Agouti apresentou menor média de sobrevida,  $171,10 \pm 29.59$  dias; Sprague-Dawley  $186,21 \pm 31.21$ . Os ratos da raça Wistar/Furth apresentaram maior tempo de sobrevida, de  $238,24 \pm 23.55$  dias e menor incidência de carcinomas (KITANO e cols., 1992).

Alguns agentes são utilizados para se estudar o estágio de promoção da carcinogênese; visam aumentar a incidência de neoplasias num menor período de tempo (BERENBLUM e SHUBIK, 1947; FUJITA e cols., 1973; OTSUBO e KAMEYAMA, 1982; ODUKOYA e SHKLAR, 1984; ). FUJINO e cols. (1965) conjugando aplicações de 4-NQO com ulcerações provocadas artificialmente na mucosa labial de camundongos obtiveram carcinoma de células escamosas em 77% dos animais num período de 180 dias. Segundo os autores, a alta incidência alcançada deve-se possivelmente à maior penetração do carcinógeno nas camadas mais profundas do epitélio em decorrência das ulcerações. O óleo de algodão aplicados em hamsters e forbol 12-13 didecanoato em camundongos iniciados com DMBA, mostraram-se agentes promotores eficazes, ocorrendo agilização no processo de carcinogênese (EVESON e MACDONALD, 1980; STLEIDER e READE, 1986).

Analisando o efeito promotor do rapé quando aplicados em bolsas produzidas artificialmente na mucosa lábil de ratos iniciados com 4-NQO, JOHANSSON e cols. (1989) não encontraram diferença significativa na formação de tumores de lábio entre os grupos tratados apenas com 4-NQO e aquele no qual o rapé foi utilizado como promotor. Posteriormente, esses mesmos autores relataram maior incidência (66%) de sarcoma de lábio em ratos que receberam aplicações de rapé após iniciação com 4-NQO, sugerindo que a diferença nos resultados obtidos ocorreu provavelmente devido à diferenças nas técnicas e doses de 4-NQO utilizadas (JOHANSSON e cols., 1991).

O papel das deficiências nutricionais e metabólicas no desenvolvimento de câncer bucal tem sido investigado por vários autores utilizando o aplicação de 4-NQO no palato de ratos como modelo experimental. Deficiências em ácidos graxos essenciais e ferro

não demonstraram exercer qualquer influência no período de desenvolvimento de carcinomas; dieta com suplemento de zinco acelera, enquanto sua deficiência retarda o desenvolvimento de carcinomas. Animais cirróticos quando tratados com 4-NQO no palato, apresentam forte reação inflamatória e aumento de permeabilidade da mucosa, porém o tempo para o desenvolvimento de carcinomas é semelhante ao observado em animais normais (LEKHOLM e WALLENLUS, 1976; WALLENLUS e cols., 1979; PRIME e cols., 1986a).

A aplicação de 4-NQO no palato de ratos constitui um modelo experimental útil para o estudo das alterações celulares, através de técnicas enzimáticas e imunohistoquímicas. Análise histoquímica da mucosa do palato de ratos que receberam três aplicações semanais de 4-NQO demonstrou que durante o processo de carcinogênese ocorre aumento do conteúdo lipídico das células epiteliais nas regiões de hiperqueratose e displasia; entretanto quando carcinomas estavam presentes, observou-se perda total do conteúdo lipídico (MATTHEWS e cols., 1986; PITIGALA-ARACHCHI e cols., 1988).

A resposta imunológica do organismo ao 4-NQO foi investigada por MATTHEWS e cols. (1986). Através de técnicas imunohistoquímicas e do uso de anticorpos monoclonais, esses autores investigaram a natureza dos tipos celulares presentes no epitélio da língua e palato de ratos durante os estágios de normalidade, pré-maligno e maligno e observaram que embora a aplicação de 4-NQO induza uma resposta imune, as células efetoras necessárias ao controle do desenvolvimento e crescimento do tumor estão ausentes. Existe forte relação entre a dose do carcinógeno e o tempo de expectativa para o desenvolvimento de carcinomas. Quando um carcinógeno completo é aplicado num órgão sensível em doses decrescentes, o período de latência do tumor é prolongado, ocorrendo ainda uma queda na incidência final do tumor. A aplicação de 4-NQO no palato de ratos por um período superior a 12 semanas resultou no surgimento de carcinomas após 8 a 21 semanas. Quando os animais foram submetidos ao tratamento por 1 a 6 semanas, transcorreu um longo período (51 a 80 semanas) até o desenvolvimento das neoplasias (SVENSON e HEYDEN, 1982).

WONG e WILSON (1983) aplicaram 4-NQO no palato de ratos por 4, 8, 12, 16, 20 e 24 semanas. Neoplasias malignas ocorreram em 85,7% dos animais com 24 semanas. Em camundongos que receberam 4-NQO na água de beber, a incidência de carcinomas de células escamosas de língua foi de 100% após 68 semanas (OHNE e cols., 1985). STLEIDER e READE (1984) aplicaram 4-NQO no palato de camundongos por 2, 4, 6, 8, 12 e 16 semanas e observaram que aumento na incidência de atipia epitelial e carcinomas de células escamosas está relacionado com maior exposição ao carcinógeno. Estudo detalhado da relação entre a dose de carcinógeno utilizada e o tempo necessário para o desenvolvimento de carcinoma foi realizado por FISKER e cols. (1987). Grupos compostos de 48 animais receberam 10 $\mu$ l de 4-NQO a 0,5% em propilenoglicol no palato 18, 12, 6 e 2 vezes. Em 50% dos animais que receberam 18, 12 e 6 aplicações, carcinoma verrucoso e carcinoma de células escamosas ocorreram após 11 e 12 e 23 meses respectivamente. Quando submetidos à 2 aplicações de 4-NQO, as neoplasias ocorreram em 25% dos animais após 30 meses. Correlação positiva entre a frequência de aplicação do carcinógeno e o grau de hiperplasia do epitélio do palato de ratos foi demonstrada por FISKER (1990).

Na carcinogênese experimental, a disqueratose focal acantolítica constitui uma alteração epitelial que precede o desenvolvimento de carcinomas; caracterizando-se pela formação de fendas suprabasais, células acantolíticas e disqueratóticas, hiperqueratose e hiperplasia da camada basal. PHILIPSEN e FISKER (1983) relataram a ocorrência de disqueratose em 50% dos ratos da variedade Wistar que receberam aplicação de 4-NQO no palato por até 18 semanas; sendo prevalente em mucosa aderida ao osso, como do palato e da gengiva vestibular.

A incidência de disqueratose focal acantolítica foi investigada por PRIME e cols., 1986 através da aplicação de 4-NQO no palato de ratos 3 vezes por semana durante nove meses. Através de análise histológica, esses autores relataram que a presença de disqueratose focal acantolítica não foi observada no palato e na língua dos animais antes de 12 semanas. Embora mais frequente no palato, não ocorreu diferença significativa na incidência desta al-

teração entre o palato e a língua. O desenvolvimento de carcinomas nesses sítios ocorreu em 100% dos ratos após 36 semanas de aplicação do carcinógeno.

NAVARRO e cols. (1993) observaram a presença de áreas de disqueratose focal acantolítica após 1, 2 e 3 meses de aplicação de 4-NQO no palato de ratos normais e sialoadenectomizados, e verificaram que áreas de disqueratose focal acantolítica ocorreram mais precocemente e atingiram maior número de ratos sialoadenectomizados. Os ratos sialoadenectomizados apresentaram disqueratose após 2 meses e os ratos normais após 3 meses de aplicação do carcinógeno, sendo mais frequentes no epitélio do palato.

### 3 CANDIDOSE BUCAL

Candidose bucal é uma infecção micótica oportunista causada por leveduras do gênero **Candida**, principalmente **Candida albicans** (SHEPERD e cols., 1985; FREITAS e BIRMAN, 1989; STENDERUP, 1990). As leveduras são os únicos fungos pertencentes à microbiota normal do homem, ocorrendo comumente na cavidade bucal de indivíduos saudáveis. Quando comparados com as bactérias, os fungos constituem uma parte insignificante da microbiota bucal (STENDERUP; 1990). **C. albicans** não se encontra uniformemente distribuída na cavidade bucal, sendo o dorso da língua seu reservatório primário. O restante da mucosa, placa bacteriana e saliva são colonizados secundariamente, em diferentes proporções (ARENDORF e WALKER, 1980).

A **C.albicans** foi considerada por muito tempo a única espécie patogênica para o homem e vários animais de laboratório (ADRIANO, 1955). FUENTES e cols. (1952) verificaram que a infecção ocorria em graus decrescentes em ratos, coelhos, cobaias e camundongos. Atualmente, espécies como **C.tropicalis**; **C. parapsilosis**; **C. guilliermondii**, **C. krusei**, são frequentemente isoladas de infecções, principalmente de indivíduos imunocomprometidos (ODDS e cols., 1989; HEYMDAHL e NORD, 1990).



**C. albicans**, é a espécie isolada com maior frequência em candidoses bucais, vaginites, infecções sistêmicas, fungemias hospitalares e de pacientes imunossuprimidos (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1974; AHEARN, 1978; ALLEN, 1982; KOMSHIAM e cols., 1989; MARINA e cols., 1991; HEIMDAHL e NORD, 1990; WILKIESON, 1991). As candidoses são muito comuns, cerca de 5% das crianças apresentam a doença na boca nas primeiras semanas de vida (BUTLER e BAKER, 1988). Infecções profundas por **C. albicans** são restritas geralmente à pacientes com doenças graves (ODDS, 1987).

A candidose bucal caracteriza-se clinicamente por lesões que geralmente assumem aspecto de placas brancas e cremosas, que podem estender-se por toda a mucosa, com localização preferencial na língua, palato e bochecha, e eventualmente pele adjacente à boca (BURNETT e cols., 1978).

A candidose bucal classifica-se em:

- 1)candidose aguda, que se subdivide nas formas pseudomembranosa e eritematosa;
- 2)candidose crônica, que se subdivide em pseudomembranosa, eritematosa, tipo "placa" e nodular;
- 3)lesões associadas à **Candida**, como queilite angular, estomatite por prótese e glossite rombóide mediana (HOLMSTRUP e AXÉLL, 1990).

Na forma pseudomembranosa aguda, as lesões geralmente se apresentam com aspecto de placas brancas e cremosas, localizando-se preferencialmente na língua, palato e bochecha, podendo eventualmente atingir gengiva e assoalho de boca (SHAFER e cols., 1985). Constitui-se de tecido necrótico, restos alimentares, leucócitos e bactérias ancoradas ao epitélio bucal por leveduras e pseudohifas de **C. albicans** que invadem a superfície queratinizada do epitélio. As camadas mais profundas do epitélio geralmente não são atingidas, entretanto mostram acantose, edema e microabcessos. Apresentam também reação inflamatória com presença de polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos. Essa forma é

diagnosticada com maior frequência em recém-nascidos e adultos debilitados (FREITAS e BIRMAN, 1989). A forma eritematosa aguda acomete principalmente o dorso da língua; as lesões caracterizam-se por áreas avermelhadas, com bordas mal definidas, ocorrendo principalmente em indivíduos sob antibioticoterapia (HOLMSTRUP e AXÉLL, 1990).

As formas crônicas pseudomembranosa e eritematosa são frequentemente encontradas em pacientes com sistema imunológico comprometido ou que utilizam corticosteróides inaláveis. A característica das lesões tipo "placa" é a presença de placas brancas, geralmente firmes e persistentes, envolvidas por eritema, presentes na maioria das vezes nos lábios. Quando ocorre a formação de pápulas ou nódulos, a candidose é denominada de nodular crônica. As formas crônicas são caracterizadas pela presença de pseudohifas na superfície do epitélio (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; HOLMSTRUP e AXÉLL, 1990).

**C. albicans** é frequentemente isolada de queilite angular, estomatite por prótese e glossite rombóide (WILKIESON e cols., 1991), porém a etiologia dessas infecções é muito discutida e acredita-se que haja associação microbiana para que elas ocorram (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

### 3.1 *Candida albicans*

#### CARACTERÍSTICAS GERAIS

Na forma de levedura, as células da **C. albicans** apresentam-se globosas, ovadas ou alongadas, medindo cerca de 3 a 7 $\mu$ m de largura e 6 a 10 $\mu$ m de comprimento. Na forma de micélio, apresentam-se como pseudohifas, podendo também formar hifas verdadeiras (ODDS, 1987). São microrganismos Gram positivos, aeróbios, podendo também crescer em anaerobiose. Quando cultivadas em meio de cultura líquido formam sedimentos; em ágar

Sabouraud a 37<sup>o</sup> C as colônias apresentam-se brancas ou branco-amareladas, com cerca de 4 a 8 mm de diâmetro, úmidas, cremosas e com odor característico (LODDER, 1971; SANDVEN, 1990). **C. albicans** produz tubo germinativo quando incubada em soro a 37<sup>o</sup>C; clamidósporos quando cultivadas em ágar-fubá; fermenta glicose, maltose, não fermenta lactose e na maioria das vezes sacarose, enquanto que a fermentação da galactose é variável. Como fonte de carbono utiliza dextrose, galactose, maltose, trealose, xilose, sacarose e manitol (KREGER VAN RIJ, 1984). É classificada em sorotipos A e B. O grau de virulência para camundongos parece não estar relacionado com os sorotipos (HASENCLEVER e MITCHELL, 1961, 1962). O sorotipo B é o mais frequentemente isolado de pacientes com o sistema imune comprometido como na AIDS (BRAWNER e CUTLER, 1984).

Nos tecidos, **C. albicans** apresenta-se na forma de micélios ou leveduras, dimorfismo característico da espécie. Na forma de leveduras aparecem como estruturas esféricas ou ovaladas, com diâmetro aproximado de 4 $\mu$ m. Apresentam paredes espessas e bem demarcadas, podendo mostrar gemulação inicial. Na forma miceliana, as pseudo-hifas são geralmente longas, de espessura variável, com septações a curtos intervalos. Quando observadas em cortes transversais, exibe secção circular, com discretas variações de calibre (PETTINATI, 1980).

**C. albicans** induz reação inflamatória aguda, com edema, acúmulo de infiltrado inflamatório neutrofílico e produção de múltiplos microabscessos. O crescimento miceliano é exuberante nas superfícies mucosas (PETTINATI, 1980). Em microscopia eletrônica, observa-se que a adesão da levedura da **C. albicans** segue dois padrões: associação fraca, com espaço preenchido por matriz que pode ser evidenciada por vermelho de rutênio ou associação firme, sem a presença de espaço entre a levedura e a célula epitelial (MARRIE e COSTERTON, 1981). As pseudohifas de **C. albicans** apresentam crescimento intracelular, podendo em alguns casos aparecer perto ou cruzando as junções intercelulares das células epiteliais (CAWSON e RAJASINGHAM, 1972).

## PATOGENICIDADE

A patogenicidade da *C. albicans* está relacionada tanto a fatores inerentes à levedura quanto ao hospedeiro. Os fatores inerentes à *Candida* ainda continuam pouco conhecidos, entretanto alguns autores sugerem sua capacidade de aderência à mucosa, habilidade de formar pseudohifas, presença de substâncias semelhantes à endotoxinas e capacidade de produzir e secretar enzimas histolíticas (ODDS, 1987; DOUGLAS, 1987).

A aderência de microrganismos às superfícies epiteliais constitui um dos fatores mais relevantes para que ocorra a colonização do tecido e consequente desenvolvimento de infecção (GIBBONS e VAN HOUTE, 1971; MARDT e WESTROM, 1976; DOUGLAS e McCOURTIE, 1983). A *C. albicans* adere-se mais firmemente às células epiteliais "in vitro" que as outras espécies de *Candida*. A adesão da levedura à superfície mucosa parece envolver interação de lectina entre a porção protéica de manoproteína, localizada na superfície da levedura e receptores de glicosídeo presentes na célula epitelial. Essa adesão pode ser acentuada por pré incubação das células epiteliais com certas espécies bacterianas ou adicionando-se carboidratos ao substrato (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

Além da capacidade de aderência às células epiteliais bucais e vaginais "in vitro" (KIMURA e PEARSALL, 1978; GHANNOUM e cols., 1990; DARWAZEH e cols., 1991), *C. albicans* apresenta aderência acentuada em coágulos de fibrina e em superfícies acrílicas "in vitro" (SAMARANAYAKE e cols., 1980; MacCOURTIE e DOUGLAS, 1981; SAMARANAYAKE e cols., 1988; SEAGAL e cols., 1988; BRANTING e cols., 1989). Quando pré-incubadas em saliva, apresentam maior capacidade de aderência às células "HeLa" e células embrionárias de rim humano, provavelmente devido à transição do microrganismo da fase de levedura para miceliana (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1982). A formação de tubo germinativo por *C. albicans* é um mecanismo que favorece a patogenicidade da espécie, visto que propicia retenção adicional da levedura às células do epitélio bucal, acrílico

e pele (KIMURA e PEARSALL, 1980; SOBEL e cols., 1984; TRONCHIN e cols., 1988; RAY e PAYNE, 1988). A inibição da formação de tubo germinativo pelo uso de drogas diminui a aderência da levedura às células (GUANNOUM e cols., 1990; SPIECHOVICZ e cols., 1990).

A produção de endotoxinas pela *C. albicans* é considerada outro importante fator de patogenicidade (CLUTER e cols., 1972). Endotoxinas de *Candida* são letais para camundongos quando injetadas endovenosamente; produzem eritema em pele de coelhos e cobaias, provocam dermatite semelhantes às doenças dermatológicas do homem, e aumentam a atividade mitótica do epitélio bucal de ratos (WINNER, 1958; MOURAD e FRIEDMAN, 1961; MAIBACH e KLIGMAN, 1962; REED e cols., 1990). A candidoxina, endotoxina produzida por *C. albicans*, é uma substância protéica de alto peso molecular, presente no citoplasma, cuja ação parece ser a de liberar histamina dos mastócitos (IWATA, 1975). Enzimas histolíticas, como fosfatases, proteinases, hialuronidase e condroitim sulfatase, produzidas por *C. albicans* constitui um mecanismo de patogenicidade, por favorecer a penetração da levedura nos tecidos (BUDTZ-JØRGENSEN, 1971; PRICE e cols., 1982; RUCHEL e cols., 1982; RUCHEL, 1984; SAMARANAYAKE e cols., 1984; BARRET-BEE e cols., 1985; SHIMIZU, 1988 e 1990; ALMEIDA, 1991). A participação das proteinases, colagenases, mucopolissacaridases e outras enzimas foi relatada como fatores de agressão das leveduras à região periodontal. A proteinase de *C. albicans* é capaz de degradar IgA secretória e sérica da saliva, diminuindo assim os possíveis efeitos protetores desses anticorpos (REINHOLDT e cols., 1987). Proteinase ácida produzida por *C. albicans* possui atividade queratolítica, podendo participar na aderência e penetração da levedura nas superfícies queratinizadas do epitélio (RAY e PAYNE, 1988).

#### 4 FATORES PREDISPOONENTES À CANDIDOSE

Apesar de ocorrer normalmente como comensal no hospedeiro humano, a *C. albicans* possui capacidade de invadir os tecidos quando as defesas locais e sistêmica do hospedeiro encontram-se comprometidas. Assim, a virulência da *C. albicans* é determinada mais pelo estado do hospedeiro que do que pelo fungo (ODDS, 1979). A boca, contrariamente à outras cavidades do organismo, está constantemente exposta a fortes estímulos mecânicos, térmicos e químicos, em decorrências aos atos fisiológicos à ela inerentes, como a mastigação. Assim, está propensa a apresentar com precocidade e frequência, alterações decorrentes de modificações sistêmicas, seja de fundo carencial, metabólico ou de outra natureza, que podem concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e hospedeiro (LACAZ, 1980).

Inúmeros são os fatores predisponentes à candidose bucal citados na literatura, sendo rara a ocorrência de doença sem a presença de um ou mais destes fatores (ALLEN, 1982; ARENDORF e cols., 1983; ARENDORF e ADDY, 1985; GHANNOUM, 1988; OKSALA, 1990; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; ).

As alterações sistêmicas que predispõe à candidose são:

- 1) Fisiológica, como idade avançada ou recém-nascido;
- 2) Traumatismos, representados por macerações ou dano químico à mucosa ou pele;
- 3) Reações de hipersensibilidade;
- 4) Desordens endócrinas;
- 5) Síndrome de mal nutrição ou maladsorção;
- 6) Câncer, principalmente as leucemias; anemias e agranulocitoses;
- 7) Estados pré operatórios; antibioticoterapia; doenças infecciosas;
- 8) Drogas imunossupressoras irradiação

Entre os fatores locais encontram-se:

- 1) Xerostomia: síndrome de Sjögren, irradiação, terapia medicamentosa;
- 2) Antibióticos;
- 3) Dieta rica em carboidratos;
- 4) Câncer bucal;
- 5) Uso de próteses e aparelhos ortodônticos mal adaptados ou inadequadamente cuidados;
- 6) Fumo;
- 7) Associação com outras doenças bucais, como glossite rombóide mediana, leucoplasia e líquen plano.

## **5 PRESENÇA DE *C. albicans* EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E MALIGNAS DA CAVIDADE BUCAL**

As leveduras são microrganismos indígenas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis; sendo a espécie ***C. albicans***, isolada em cerca de 60 a 70% dos casos (STENDERUP, 1990). Cerca de 5 a 7% dos recém-nascidos já apresentam ***C. albicans*** na boca 24 horas após o nascimento, após 1 semana, 14,21% das crianças são portadoras da levedura (RUSSEL e LAY, 1973; LAY e RUSSEL, 1977). A presença de ***Candida*** foi relatada em 49% em crianças entre 3 a 5,5 anos e em cerca de 5% das crianças entre 6 e 12 anos (BERDICEVSKY e cols., 1984). Não está bem estabelecido porque alguns indivíduos são portadores e outros não, entretanto STENDERUP, 1990 sugere que fatores nutricionais, interações da levedura com a microbiota bacteriana e a presença de anticorpos específicos possam ser relevantes. Em indivíduos saudáveis, as contagens de levedura geralmente apresentam-se baixas, geralmente inferiores a 400 unidades formadoras de colônia por ml (WILLIANSO; 1972; EPSTEIN e cols., 1980; BURFORD-MASON e cols., 1988; OLSEN e STENDERUP, 1990). Em

pacientes hospitalizados, **C. albicans** é isolada em valores superiores a 80%; atingindo índice semelhante em pacientes aidéticos (ODDS, 1987; KOMSHIAN e cols., 1989; FRANKER e cols., 1990; WILKIESON e cols., 1991).

Radioterapia de cabeça e pescoço, predispõe o aumento na quantidade de **C. albicans** na boca. RUSSEL e cols. (1987) relatam aumento do número de leveduras recuperadas em 47% dos pacientes que apresentavam culturas positivas antes da radiação.

Leucoplasia, eritroplasia e lichen plano são lesões consideradas potencialmente malignas. O número de leucoplasias bucais que passam por transformação maligna varia entre 0,13 e 6,0%, embora estes valores estejam relacionados com o tempo de observação do progresso da lesão (BÁNÓCZY e SUGAR, 1970; BÁNÓCZY, 1977). As leucoplasias são divididas nas formas homogêneas e não homogêneas. A forma homogênea apresenta uma superfície ondulada e macia. O tipo não homogêneo pode ser dividido em eritroplasia, lesões brancas intercaladas com áreas avermelhadas; leucoplasia nodular, lesões brancas com áreas nodulares e granulares; e leucoplasia verrucosa, lesão exofítica com projeções pontiagudas e grosseiras ( AXÉLL e cols., 1984). A progressão das leucoplasias do tipo não homogêneo para câncer varia entre 7 a 49%. Todas as formas de leucoplasia podem ser infectadas por **Candida**, entretanto o tipo não homogêneo apresenta maior pré-disposição à invasão e à alterações neoplásicas (PINDBORG e cols., 1963; 1968; SILVERMAN e ROZEN, 1968; ROED-PETERSEN, 1971; HOMSTRUP e DABELSTEEN, 1974; SILVERMAN e cols., 1984; HOGEWIND e cols., 1989; BÁNÓCZY e RIGÓ, 1991).

**C. albicans** é a espécie mais isolada das lesões leucoplásicas da cavidade bucal, principalmente do tipo não homogêneo; sendo que os biotipos de **C. albicans** isolados de lesões leucoplásicas frequentemente diferem dos biotipos isolados da mucosa normal (KROGH e cols., 1987). CAWSON (1966) descreve a presença de **Candida** em quinze de 171 amostras de leucoplasia e em duas de seis carcinomas. Em vinte e sete amostras de liquem plano, a levedura estava ausente. Paraqueratose, edema e infiltrado inflamatório polimorfonuclear foram observados nas regiões de leucoplasia, onde pseudohifas penetravam a



camada queratinizada do epitélio. Em 1968, CAWSON e LEHNER sugerem uma relação etiológica da **C. albicans** em leucoplasias, baseados no fato de ocorrer regressão das lesões com tratamento com antifúngicos. Leucoplasia do tipo não homogêneo, considerada um estágio clínico avançado de precancer bucal, é quase invariavelmente invadida por **Candida**.

RENSTRUP (1970) encontrou invasão por **Candida** em 61% das amostras de leucoplasia do tipo não homogêneo; em 71% dessas lesões foi observado atipia celular. Apenas 3% das lesões do tipo não homogêneo apresentaram invasão por **Candida**. DAF-TARY e cols. (1972), descreveram em quarenta e nove leucoplasias, invasão por **Candida** em vinte e sete do tipo homogêneo; vinte e dois do tipo não homogêneo. Embora a presença de **Candida** seja frequente em lesões pré-cancerosas, está ausente na maioria dos carcinomas bucais (CAWSON, 1966; BURKHARDT e SEIFERT, 1977).

Vários estudos experimentais buscam esclarecer a influência exercida por **C. albicans** e outros fungos no desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas. A capacidade de algumas espécies de **Candida** e outros fungos em induzir ou intensificar o desenvolvimento de tumores malignos em animais tem sido demonstrada há muitos anos (MANKOWSKI, 1963; LANCASTER e cols., 1961; BLANK e cols., 1968; HSIA e cols., 1981; FIELD e cols., 1989). Candidose induzida experimentalmente na boca de ratos, demonstrou que a infecção produzida pelo microrganismo, embora confinada à camada córnea, está associada a alterações significativas nos tecidos epiteliais e subepiteliais, sugerindo pelo menos um papel co-causativo da infecção por **Candida** em alguns casos de leucoplasia bucal humana (JONES e RUSSEL, 1973). MANKOWSKI (1963) observou que após injeção de **C. albicans** no baço de ratos Wistar, ocorreu aumento significativo no número de tumores malignos em vários órgãos. Extratos de **C. parapsilosis** quando injetados subcutaneamente em camundongos por quatro semanas, levaram ao desenvolvimento de sarcomas em seis dos dezesseis animais; enquanto a frequência de linfomas aumentou significativamente em animais inoculados com extratos de **C. albicans** e **Trychophyton sp** (BLANK e cols., 1968). Ratos e camundongos recém-nascidos injetados com metilcolantreno, desenvolveram tumores

subcutâneos com maior frequência, em períodos mais curtos e de maior diâmetro, quando estimulados concomitantemente por injeções de glicoproteínas de **C. albicans**, do que os animais tratados apenas com metilcolantreno (MANKOWSKI, 1971). Células de fibrossarcoma de camundongos infectadas por **C. albicans** e injetadas em camundongos singênicos, resultam no desenvolvimento, invasão e ocorrência de metástases mais rápida e frequentemente que nos animais injetados com células de fibrossarcoma não infectadas pela levedura (GINSBURG e cols., 1987).

Alguns biotipos de **C. albicans** estão implicados na etiologia do cancer bucal devido a produção de nitrosaminas endógenas. Em algumas regiões da China é alto o índice de carcinoma de esôfago, provavelmente devido à alta concentração de nitrato e nitrito na água de beber, os quais constituem precursores do carcinógeno benzilmetilnitrosamina. **C. albicans** é frequentemente isolada de pacientes com lesões pré-malignas e com carcinoma de esôfago. HSIA e cols. (1981) demonstraram que biotipos de **C. albicans** têm capacidade de aumentar a produção de benzilmetilnitrosamina através de seus precursores, sugerindo um papel da **C. albicans** no desenvolvimento de carcinomas de esôfago nestes pacientes.

## 6 CANDIDOSE BUCAL EXPERIMENTAL

Numerosos modelos experimentais têm sido utilizados para se estudar candidose bucal. Infecção na boca de coelhos foi descrita por MacKINNON (1936); e em galinhas gnotobióticas por BALISH e PHILLIPS (1966). Modelos esperimentais utilizando macacos (BUDTZ-JØRGENSEN, 1971b, 1973, 1975; OLSEN e HAANAES, 1977), ratos (JONES e ADAMS, 1970; ROGERS e BALISH, 1980) e camundongos (PHILLIPS e BALISH, 1966; LACASSE e cols., 1990) já foram descritos. O rato como modelo experimental é amplamente utilizado no estudo da influência dos fatores locais e sistêmicos predisponentes à candidose e da resposta do hospedeiro à infecção. ADAMS e JONES, (1971)

inocularam **C. albicans** na cavidade bucal de trinta ratos, e observaram o desenvolvimento de infecção em cinco animais. A infecção ocorreu principalmente na borda gengival, alterando o grau de queratinização do epitélio, causando discreto envolvimento do tecido conjuntivo.

As alterações epiteliais produzidas por inoculações de **C. albicans** por períodos curtos ou prolongados na cavidade bucal de ratos, conjugadas ou não a outros fatores predisponentes, como o uso de antibióticos, uso de próteses ou xerostomia foram descritas por vários autores (JONES e RUSSEL, 1973; ALLEN e cols., 1982; FISKEER e cols., 1982; ALLEN e BECK, 1987; JORGE, 1991). JONES e RUSSEL (1974), relataram a incidência de candidose na mucosa da língua em 55% dos ratos inoculados com **C. albicans** durante vinte e duas semanas. As pseudohifas de **C. albicans** penetraram apenas a camada córnea do epitélio, e estavam associadas com a perda das projeções das papilas linguais e hiperqueratose. Acúmulo de células mononucleares e significativa alteração da camada muscular mais superficial também foram observadas. Em ratos inoculados com **Candida** durante 6, 9 e 12 meses, candidose foi observada histologicamente em 15, 40 e 20% dos animais respectivamente (JONES e cols., 1976).

FISKEER e cols. (1982) analisaram a permanência e o índice de infecção por **C. albicans** na cavidade bucal de ratos que receberam tratamento prévio com tetraciclina e foram inoculados com **C. albicans** durante 34 semanas. **C. albicans** foi recuperada da boca de 50% dos animais após 6 dias da última inoculação enquanto apenas 25% apresentaram a presença de pseudohifas no interior do epitélio. Os focos de candidose localizaram-se basicamente nas dobras dos sulcos, margem gengival e bochecha. Sinais de candidose de longa duração foram observados apenas na superfície dorsal da língua; caracterizados por perda das papilas linguais e substituição por epitélio plano e paraqueratótico, hiperplásico e acantótico.

Em ratos inoculados com **C. albicans** durante 40 semanas, a presença de candidose foi observada principalmente na porção mediana do terço posterior do dorso da língua, apresentando aspectos clínicos e histológicos similares à glossite rombóide mediana (ALLEN e cols., 1982). Lesões clinicamente visíveis foram observadas por ALLEN e cols.,

(1988), na língua de ratos inoculados com *C. albicans* durante 20 semanas. Os animais foram divididos em 2 grupos: 8 animais receberam 20 mg/kg/dia de ketoconazole por duas semanas e 9 animais não receberam tratamento. Nos animais tratados, todas as lesões regrediram enquanto apenas 2 ratos do grupo controle apresentaram regressão das lesões. Os autores sugerem que as alterações epiteliais causadas pela inoculação da levedura por 20 semanas são reversíveis.

## 7 XEROSTOMIA

Aproximadamente 90% da secreção salivar é produzida por três pares de glândulas salivares maiores: parótida, submandibular e sublingual. O restante é produzido por numerosas glândulas menores, distribuídas pela cavidade bucal, exceto gengiva e porção anterior do palato duro (HERRERA e cols, 1988). Os produtos de secreção das glândulas salivares podem ser divididos basicamente em dois tipos: seroso e mucoso. A saliva serosa é aquosa, rica em proteínas e sua secreção está relacionada à estímulos olfatório, gustatório e mastigatório. A saliva mucosa é composta de glicoproteínas altamente viscosas, cuja secreção é independente de estímulos conhecidos (SUDDICK e DOWD, 1980). A quantidade e composição da saliva dependem da natureza do estímulo que inicia a ação dos nervos simpático e parassimpático (GARRET, 1987).

A saliva é importante na fisiologia orofaríngeana, na digestão e na proteção das células gástricas. Na digestão, a ação da amilase e lipases salivares já foram descritas por vários autores (HAMOSH e BURNS, 1977; FIELD e cols., 1987). Na cavidade bucal, a saliva participa dos processos de mastigação, fala, deglutição, lubrificação dos tecidos, sensibilidade gustativa devido à presença da proteína gustina, mediadora do paladar; proteção das mucosas contra a penetração de diversas substâncias, regulação do pH bucal devido à sua capacidade tampão e formação da placa bacteriana (SHATZMAN e HENKIN, 1981; MANDEL, 1987). A proteção da cavidade bucal pela saliva deve-se à remoção mecânica de resíduos alimentares e

microrganismos. A saliva participa na manutenção do equilíbrio da microbiota bucal através da agregação e redução da aderência de microganismos, de sua ação antibacteriana, antivirótica e antifúngica. Participa também na maturação pós eruptiva do esmalte; regulação do balanço iônico nos processos de remineralização do esmalte; deposição da película adquirida e limitação da difusão de ácidos (MANDEL, 1989).

Alterações clínicas como a síndrome de Sjögren, medicamentos, radioterapia, doenças locais e sistêmicas, são as causas mais comuns que levam à disfunção das glândulas salivares e conseqüente xerostomia (GLASS e cols., 1984; MANDEL, 1990; EDGARD, 1990; 1992). A xerostomia pode produzir fissuras na língua e lábios e frequentes ulcerações. A falta de lubrificação resulta na aderência da língua e bolo alimentar à mucosa bucal ou superfícies de dentes e próteses, dificultando a mastigação, deglutição e fonação (HERRERA e cols., 1988). A xerostomia também aumenta a incidência de cáries em humanos (GLASS e cols., 1984; JANSMA e cols., 1988; EPSTEIN e cols., 1992). A atrofia da mucosa bucal e aumento da incidência de cáries em pacientes idosos parece estar associada à diminuição de saliva (WALLACE e PETRUSNECK, 1985).

As substâncias antimicrobianas presentes na saliva são as principais responsáveis pelo controle da microbiota bucal. A lisozima, causa destruição de células bacterianas, especialmente *Streptococcus mutans*, provavelmente devido à ativação de autolisinas bacterianas; inibe o crescimento ou reduz a incorporação de glicose por algumas bactérias (TWETMAN e LINDQUIST, 1985; TWETMAN e cols., 1986; POLLOCK e cols., 1987). A lactoferrina é efetiva contra microrganismos aeróbios ou facultativos que utilizam o ferro em seu metabolismo, competindo pela ligação ao ferro, privando o microrganismo deste nutriente essencial; entretanto existem algumas espécies bacterianas com capacidade de digerir a lactoferrina, utilizando-a como fonte de ferro (MANDEL, 1989; EDGARD, 1992). A peroxidase salivar faz parte de um sistema que envolve a oxidação de tiocianato pelo peróxido de hidrogênio, gerado pelas bactérias, em hipotiocianato, que afeta o metabolismo bacteriano (TENOVUO e cols., 1982). A IgA da saliva, possui como característica a capacidade de inibir

a aderência bacteriana, neutralizar microrganismos e suas toxinas e constituem agentes efetivos na inibição da transmissão do HIV e outros vírus como o **Herpes simplex** (McNABB e TOMASI, 1981; HERRERA e cols., 1988; MANDEL, 1989).

A agregação de bactérias por glicoproteínas de alto peso molecular presentes na saliva, favorece a eliminação dos microrganismos da cavidade bucal (van HOUTE, 1983; BABU e cols., 1986; KOOP e cols., 1987). Ação antifúngica foi observada em polipeptídeos ricos em histidina presentes na saliva da parótida, os quais inibem o crescimento de **C. albicans** "in vitro" e possivelmente exerçam a mesma ação "in vivo" (POLLOCK e cols., 1984). A mucina, uma glicoproteína de alto peso molecular produzida basicamente pelas glândulas salivares menores, é a principal substância envolvida no processo de lubrificação e controle da permeabilidade da mucosa bucal. Apresentam baixa solubilidade, alta viscosidade, elasticidade e adesividade, podendo formar barreira efetiva contra bactérias e ressecamento da mucosa bucal. Também protegem a mucosa, resistindo à ação de proteases produzidas por bactérias, no sulco gengival, e por leucócitos polimorfonucleares em degeneração (TABAK e cols., 1982; MANDEL, 1987).

Inúmeros são os mecanismos presentes na saliva responsáveis pela manutenção da integridade da cavidade bucal. Quaisquer alterações que levem a um estado de xerostomia, podem romper o equilíbrio ecológico da cavidade bucal, favorecendo o desenvolvimento de infecções. A xerostomia em humanos pode ser temporária, devido à sialadenite ou uso de medicamentos. Casos graves de xerostomia podem ser encontrados em indivíduos após radioterapia, na síndrome de Sjögren, portadores de certas doenças sistêmicas e em casos de aplasia glandular (BERTRAN, 1967; GRAD e cols., 1985; HERRERA e cols., 1988; MANDEL, 1990).

A idade avançada pode ser um fator predisponente à xerostomia (OSTERBERG e cols., 1984). Estudos experimentais têm demonstrado que animais xerostômicos apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de cáries (KLAPER e VOKER, 1953; SHAW e WOLLMAN, 1958; BOWEN e cols., 1988 a e b; ITO, 1990).

O papel da saliva na proteção da cavidade bucal por *C. albicans* é controverso. Componentes específicos da saliva podem mediar a aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais. (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1981; 1982; GHANNOUM e cols., 1990; DARWAZEH e cols., 1991). Entretanto, há evidências de que a IgA salivar inibe a adesão de *C. albicans* às células epiteliais da boca (EPSTEIN e cols., 1982; VUDHICHAMNONG e cols., 1982).

A diminuição do fluxo salivar é uma condição que predispõe à infecções por fungos na boca (EPSTEIN e cols., 1983; HERNANDES e DANIELS, 1989; SCULLY, 1989 MacCARTHY, 1992). Pacientes com síndrome de Sjögren ou submetidos à radiações na cabeça e pescoço apresentam alta incidência de *C. albicans* na cavidade bucal (BROWN e cols., 1975; TAPPER-JONES e cols., 1981).

Em modelos experimentais, JORGE (1991) relata a incidência de candidose na língua em 70% dos ratos xerostômicos e em 20% dos ratos normais que receberam 3 inoculações semanais de *C. albicans* durante 32 semanas, sugerindo que a xerostomia facilitou a permanência da levedura e a colonização do epitélio pela levedura. Através da inoculação de *C. albicans* por 3 dias alternados, FISKER e cols., (1982) observaram alta incidência inicial de infecção, seguida de rápido declínio após cinco semanas da primeira inoculação. A penetração de pseudohifas no interior do epitélio foi observada e 33% dos animais. Os locais mais frequentes de infecção foram a gengiva marginal (98,8%), a mucosa do sulco gengival e lingual e a língua. Esses autores relacionaram a alta seletividade de adesão às características do epitélio e presença e natureza da queratina.

JONES e ADAMS (1970) não observaram diferença na incidência de candidose em ratos cuja xerostomia foi induzida através do uso de hioscina. Placas acrílicas inoculadas com *C. albicans* foram inseridas em macacos que tiveram o fluxo salivar reduzido com injeções de oxifenciclimina. Após uma semana, esses animais apresentaram lesões no palato mais extensas e com regressão mais lenta em relação ao grupo controle, sugerindo que a saliva poderia exercer algum efeito protetor, impedindo a colonização de *C. albicans* na

superfície da próteses (OLSEN e HAANAES, 1977). Ratos com o fluxo salivar reduzido apresentam maior número de leveduras na cavidade bucal. A permanência de **C. albicans** na cavidade bucal de ratos sialoadenectomizados foi estudada por TOTTI, 1994. Após 4 inoculações consecutivas de  $10^8$  células de **C. albicans**, a levedura foi recuperada em maior quantidade e persistência da cavidade bucal dos ratos xerostômicos, permanecendo superior até 30 dias da última inoculação.



## PROPOSIÇÃO

## PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação de *C. albicans* e da sialoadenectomia no desenvolvimento de carcinoma bucal em ratos causado pelo 4-NQO.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 ANIMAIS

Foram utilizados 112 ratos (**Rattus norvegicus, Albinus, Wistar**), machos, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram distribuídos em número de cinco por caixa plástica, sendo alimentados com ração comercial Purina e água "ad libitum".

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental.

### 2 SIALOADENECTOMIA

A remoção cirúrgica das glândulas salivares maiores, parótida, submandibular e sublingual foi realizada de acordo com a técnica proposta por CHEYNE (1939).

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral a 10% (400 mg/kg de peso corporal). A região cervical foi submetida à tricotomia e antissepsia com álcool iodado a 2%. A porção cervical mediana foi excisionada com bisturi e com a dissecação cuidadosa dos tecidos subjacentes, as glândulas salivares maiores foram expostas.

Localizadas na região infra-hióide encontram-se as glândulas submandibulares e sublinguais, as quais apresentam-se separadas apenas por fina camada de tecido conjuntivo, assumem aspecto macroscópico de um bloco único, possibilitando sua remoção simultânea. A remoção das glândulas foi realizada após prévia ligadura dos ductos e vasos sanguíneos. As glândulas parótidas, estendem-se da região massetéica até a altura da clavícula e foram

removidas divulsionando-se o tecido com pinças clínicas. Após remoção das glândulas e sutura da incisão, a região foi novamente banhada com álcool iodado e os animais mantidos sob aquecimento até que o efeito do anestésico tivesse cessado. Os animais submetidos à cirurgia foram utilizados nos experimentos após intervalo de 15 dias.

### 3 PRESENÇA DE *C.albicans* NA BOCA DE RATOS

Antes do início do experimento, os animais que seriam inoculados com *C. albicans* foram submetidos à coleta de material da cavidade bucal para pesquisa de *C. albicans*. Um mini swab esterilizado foi passado por toda a cavidade bucal dos ratos, especialmente sobre o palato e a língua e imediatamente semeado em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO), contendo 0,1 mg/ml de meio de cloranfenicol (Quemicetina Succinato, Carlo Erba). As placas foram incubadas a 37<sup>o</sup>C durante dois a sete dias. Das colônias características foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram para confirmação microscópica. Dos 242 ratos, vinte e sete apresentaram cultura positiva para *Candida* e foram excluídos do experimento.

Nos animais sialoadenectomizados, outra pesquisa foi realizada sete e quinze dias após a cirurgia, para constatar se a cirurgia não favoreceu a implantação de *Candida* na boca dos ratos. Nenhum animal foi positivo.

### 4 INOCULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE *C. albicans* DA CAVIDADE BUCAL DE RATOS NORMAIS E SIALOADENECTOMIZADOS.

A suspensão de *C. albicans* foi obtida a partir de amostra (F-72), isolada de paciente com estomatite por prótese total, que foi semeada em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose de modo a se obter um crescimento maciço. As placas foram incubadas a 37<sup>o</sup> C por 48 horas, quando então o crescimento foi transferido para tubos de ensaio. O material foi suspenso em 5ml de solução fisiológica esterilizada e centrifugado a 2000 rotações por minuto

(r.p.m.), durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e esse procedimento foi repetido mais uma vez. O sedimento foi ressuspensão em 5 ml de solução fisiológica e homogeneizado.

O número de células de *C. albicans* viáveis presentes na suspensão foi determinado mediante contagem em câmara de Neubauer, após coloração prévia com azul de metileno a 0,05% (REED e cols, 1990). A suspensão foi padronizada de modo a se obter aproximadamente  $5 \times 10^8$  células viáveis/ml.

#### 4.1 INOCULAÇÃO DE *C. albicans*

Os animais normais e xerostômicos, não anestesiados, foram inoculados com suspensão de *C. albicans* contendo  $5 \times 10^8$  células/ml. Um swab esterilizado foi embebido na suspensão e passado, sobre a superfície dorsal da língua e do palato. Durante a inoculação, o swab foi pressionado levemente para que seu conteúdo fosse depositado sobre essas superfícies. Após cada inoculação os animais foram privados de água por 1 hora. O volume do inóculo foi calculado, pesando-se o swab antes e depois de embebido na suspensão, obtendo-se o valor de aproximadamente 0,2 ml.

#### 4.2 RECUPERAÇÃO DE *C. albicans*

A quantidade de leveduras presentes na cavidade bucal foi verificada coletando-se saliva com uma "bolinha" de algodão previamente esterilizada e pesada, que foi introduzida na cavidade bucal dos ratos com auxílio de pinça hemostática esterilizada.

Durante 5 minutos, a "bolinha" de algodão foi passada delicadamente em todas as regiões da boca. Após esse período, a "bolinha" de algodão foi novamente pesada e o volume de saliva coletado determinado pela diferença de peso obtida. O material foi colocado

em tubo de ensaio, o volume de saliva completado para 2 ml com solução fisiológica esterilizada e homogeneizado por 2 minutos.

Foram realizadas diluições decimais até  $10^{-5}$ . 0,1 ml de cada diluição foi semeado em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As colônias características de **C. albicans** foram contadas em placas que continham de 30 a 300 colônias. O cálculo foi realizado a partir da quantidade de saliva coletada e do número de colônias (UFC/ml) encontrado.

## 5 APLICAÇÃO DO 4-NQO

Nitroquinolina diluída a 0,5% em propilenoglicol foi pincelada no palato dos animais 3 vezes por semana em dias alternados. O carcinógeno foi aplicado nos animais não anestesiados, com auxílio de uma pinça clínica e pincel nº 4. Aproximadamente  $15\mu\text{g}$  de 4-NQO foi pincelado no palato num único movimento. Após cada aplicação, os animais foram privados de água por um período de 2 horas.

## 6 OBSERVAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Os animais foram mortos por inalação excessiva de éter etílico, quando apresentavam carcinoma na cavidade bucal. Em algumas situações, as lesões eram de difícil observação clínica, porém nestes casos os animais mostravam debilidade física, caracterizada por emagrecimento rápido e acentuado, prostração, dificuldade de deglutição e falta de asseio corporal. A língua, maxila, mandíbula e estômago foram retirados, analisados macroscopicamente sob lupa estereoscópica (Zeiss). Após fixação em formol a 10%, foram processados para análise histológica.

Para observações em microscopia de luz, os tecidos duros foram descalcificados em EDTA a 5%. A língua foi seccionada no sentido sagital em duas partes. O corte foi realizado sobre o sulco mediano da região anterior e o centro da papila valada, no terço posterior da língua. Do palato, mandíbula e estômago foram processadas histologicamente áreas com alterações mais acentuadas. Posteriormente o palato cortado em três regiões entre os dentes molares e a mandíbula no sentido vestibulo-lingual. Após inclusão em parafina, os cortes obtidos foram corados em H&E e pela técnica de PAS+hematoxilina.

## 7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

### 7.1 INOCULAÇÃO DE *C. albicans*

#### A) 3 dias

Dez ratos normais foram inoculados na cavidade bucal com 0,2 ml de suspensão de *C. albicans* por três dias consecutivos. Após 24 horas da última inoculação, a saliva dos animais foi coletada para determinação do número de UFC/ml de *C. albicans* presente na cavidade bucal dos animais. A seguir, os animais foram mortos por inalação excessiva de éter etílico, a língua, maxila, mandíbula e estômago retirados, analisados macroscopicamente e processados para análise histológica. A inoculação de *C. albicans* foi realizada no período em que os animais do item B receberam a última inoculação.

#### B) 180 dias

Foram usados dez ratos normais inoculados com *C. albicans* 3 vezes por semana em dias alternados durante seis meses (180 dias). Após 24 horas da última inoculação, o procedimento adotado foi semelhante ao item A (acima descrito).



## 7.2 APLICAÇÃO DE 4-NQO POR 5 MESES, SEGUIDA DE *C. albicans* POR 3 DIAS CONSECUTIVOS

Dez ratos normais foram pincelados com 4-NQO no palato 3 vezes por semana, em dias alternados, durante cinco meses. Após este período, os animais receberam três inoculações consecutivas de suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal. Vinte e quatro horas após a última inoculação, a saliva dos animais foi coletada para quantificação do número de leveduras (UFC/ml) presentes na cavidade bucal. A seguir, os animais foram mortos por inalação de éter etílico, a língua, maxila, mandíbula e estômago foram retirados, analisados macroscopicamente sob lupa estereoscópica e processados histologicamente.

## 7.3 FORMAÇÃO DE CARCINOMAS

Foram utilizados 40 ratos normais e 15 sialoadenectomizados divididos nos seguintes grupos (Tabela 1).

A) Dez ratos normais foram pincelados com 4-NQO no palato 3 vezes por semana durante 5 meses. Após este período, não receberam tratamento até o desenvolvimento de carcinoma de boca, quando foram mortos. A língua, maxila, mandíbula e estômago foram retirados e analisados macro e microscopicamente.

B) Quinze ratos normais foram pincelados com 4-NQO no palato 3 vezes por semana durante cinco meses. Após este período, foram inoculados com suspensão de *C. albicans* 3 vezes por semana em dias alternados até o desenvolvimento de carcinomas bucais. A saliva foi coletada para quantificação do número de *C. albicans* presente na cavidade bucal dos

animais 24 horas após a última inoculação. A seguir, os animais foram mortos, a língua, maxila, mandíbula e estômago foram retirados, analisados macroscopicamente e processados para análise histológica.

C) Cinco ratos normais e cinco sialoadenectomizados foram pincelados com 4-NQO no palato 3 vezes por semana durante cinco meses. Após esse período, continuaram a receber o mesmo tratamento até o desenvolvimento de carcinoma de boca, quando foram mortos. O procedimento seguido foi o mesmo utilizado para o grupo A.

D) Dez ratos normais e dez sialoadenectomizados foram pincelados com 4-NQO e inoculados com **C. albicans** concomitantemente até o desenvolvimento de carcinomas bucais. A aplicação do carcinógeno e a inoculação da levedura foi realizada no mesmo dia respeitando-se um intervalo de cinco a sete horas entre um tratamento e outro. A saliva foi coletada 24 horas após a última inoculação para quantificação de **C. albicans** na cavidade bucal e o procedimento seguido foi semelhante aos demais grupos experimentais.

Tabela 1 - Grupos de ratos sacrificados quando desenvolveram carcinomas de boca após tratamento com 4-NQO associado ou não com *C. albicans*.

GRUPOS	TRATAMENTO DURANTE 5 MESES	TRATAMENTO APÓS 5 MESES E ATÉ FORMAÇÃO DE CARCINOMA	NORMAL	SIALOADENEC TOMIZADO
A	4-NQO	—	10	—
B	4-NQO	<i>C. albicans</i>	15	—
C	4-NQO	4-NQO	5	5
D	4-NQO e <i>C.albicans</i>	4-NQO e <i>C. albicans</i>	10	10
TOTAL			40	15

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1- RECUPERAÇÃO DE *C. albicans* E CANDIDOSE APÓS INOCULAÇÃO DURANTE 3 E 180 DIAS

#### 1.1- Recuperação de *C. albicans*

Após 3 dias consecutivos de inoculação de *C. albicans*, o número de leveduras (UFC/ml) recuperado da cavidade bucal dos ratos foi cerca de 6 vezes maior do que quando inoculados durante seis meses, com valores de  $1,36 \times 10^4 \pm 1,60$  e  $0,20 \times 10^4 \pm 0,26$  respectivamente.

#### 1.2 Candidose

Após 3 inoculações consecutivas da suspensão de *C. albicans*, cinco ratos normais (50%) apresentaram nove áreas de candidose nas papilas cônicas simples e dois ratos (20%), três áreas no tubérculo intermolar. A invasão do epitélio por pseudohifas na região das papilas cônicas simples foi observada apenas na camada queratinizada, principalmente nos espaços interpapilares pronunciados dessa região, sem invasão ou alteração das demais camadas do epitélio, exceto a presença de discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Nas áreas de candidose do tubérculo intermolar, observou-se epitélio hiperqueratótico, acantótico e infiltrado por células inflamatórias polimorfonucleares. Em algumas regiões, ocorreu aplainamento das papilas linguais. Candidose no palato ocorreu em 1 rato (10%). Duas áreas com a presença de

pseudohifas no interior da camada de queratina foram observadas na mucosa próxima ao dente, não ocorrendo alterações nas camadas epiteliais subjacentes.

Após 180 dias de inoculação, apenas um (10%) rato apresentou uma área de candidose na região das papilas gigantes e uma área no palato. Na língua a candidose caracterizou-se pela presença de poucas pseudo-hifas e discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear no interior da queratina. Neste local, observou-se hiperplasia da camada basal, presença de células hialinizadas com núcleo picnótico e deslocado para a periferia, acantose e aplainamento das papilas linguais. No palato raras pseudo-hifas foram observadas próximas ao segundo molar, onde o epitélio apresentou discreta hiperqueratose.

Como citado em Material e Métodos, a inoculação de *C. albicans* por 3 dias consecutivos foi realizada no mesmo período em que os animais inoculados por 180 dias receberam a última inoculação. O peso inicial apresentado pelos ratos inoculados por 3 dias foi  $173,00 \pm 9,00$  e dos ratos tratados durante 180 dias de  $165,10 \pm 15,25$ , atingindo respectivamente  $451,30 \pm 26,79$  e  $427,40 \pm 59,58$  ao término do experimento.

## **2- APLICAÇÃO DE 4-NQO POR 5 MESES, SEGUIDO DE 3 INOCULAÇÕES CONSECUTIVAS DE *C. albicans***

### **2.1- Recuperação de *C. albicans***

$2,60 \times 10^4 \pm 2,70$  UFC/ml de *C. albicans* foram recuperadas da cavidade bucal dos animais tratados com 4-NQO por cinco meses e em seguida, com *C. albicans* por 3 dias. Estes valores não foram estatisticamente diferentes dos obtidos em ratos tratados com *C. albicans* pelo mesmo período, porém sem 4-NQO.

## 2.2- Candidose

Todos os ratos (10) apresentaram candidose na região do tubérculo intermolar (31 áreas) e 50% também nas papilas cônicas simples (14 áreas). Das 31 áreas de candidose, em 25 o epitélio apresentou acantose e hiperqueratose, com aplainamento das papilas linguais e por vezes descamação da camada de queratina, sendo frequente os microabscessos intraepiteliais. Duas áreas ocorreram em papilomas e em quatro não se observou alterações epiteliais.

Quatro ratos (40%) apresentaram sete áreas de candidose no palato, localizadas predominantemente na gengiva aderida ao dente. O epitélio apresentou-se acantótico, hiperqueratótico, com discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

Tabela 2 - Total de áreas de candidose na língua e palato de ratos normais inoculados com *C. albicans* por 3 e 180 dias e tratados com 4-NQO por 5 meses e inoculados com *C. albicans* por 3 dias. Entre parênteses a porcentagem de animais com candidose n= 10.

CANDIDOSE GRUPOS	LÍNGUA		PALATO
	TI	PCS	
<i>C. albicans</i> 3 dias	3(20)	9(50)	2(10)
<i>C. albicans</i> 180 dias	1(10)	—	—
4-NQO + <i>C. albicans</i> 3 dias	31(100)	14(50)	7(40)

TI - Tubérculo intermolar

PCS - Papilas cônicas simples

## 3- Morfologia

Macroscopicamente, observou-se perda de definição das rugosidades palatinas em 60 % dos animais. Projeções epiteliais e papilomas estavam presentes em

30 e 10% dos animais respectivamente. Na língua, o epitélio da região do tubérculo intermolar apresentou áreas leucoplásicas, com cerca de 2 a 4 mm de diâmetro; regiões com aplainamento das papilas linguais; projeções epiteliais e papilomas. Histologicamente, os epitélios do tubérculo intermolar e palato estavam aplainados, com hiperqueratose, acantose e hiperplasia da camada basal. Por vezes observou-se tanto no palato quanto na língua disqueratose focal acantolítica, caracterizadas pela presença de células eosinofílicas e disqueratóticas, parcialmente hialinizadas, arredondadas e circundadas por halos claros.

Tabela 3 - Número de alterações macroscópicas observadas no palato e língua dos ratos tratados com 4-NQO por 5 meses e *C. albicans* por 3 dias consecutivos. Entre parênteses a porcentagem de animais com alterações. n=10.

ALTERAÇÕES	PALATO	LÍNGUA
ATROFIA DE PAPILAS	—	15(70)
LEUCOPLASIA	—	23(80)
PROJEÇÕES EPITELIAIS	7(30)	1(10)
PAPILOMAS	1(10)	2(20)

### 3 - FORMAÇÃO DE CARCINOMAS

Como descrito nas páginas 40 e 41, os animais foram divididos em grupos **A, B, C, D**. Todos os animais foram mortos quando apresentaram carcinomas na boca.

**A** - 4-NQO 5 meses

**B** - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

**C** - 4-NQO até a formação de carcinoma

**D** - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma



## 3.1- Peso corporal

A tabela 4 mostra o peso inicial e final dos animais, i.e, até o desenvolvimento de carcinomas bucais. Entre os animais normais (sem remoção das glândulas salivares maiores), o peso final foi estatisticamente menor para o grupo C que recebeu tratamento contínuo com 4-NQO. Nos grupos C e D, os ratos sialoadenectomizados apresentaram valores significativamente menores em relação aos normais do mesmo grupo.

Tabela 4 - Peso corporal em gramas de ratos normais e sialoadenectomizados que receberam tratamento com 4-NQO, com ou sem *C. albicans*, até o desenvolvimento de carcinomas.

GRUPO	NORMAL		SIALOADENECTOMIZADO	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
A	164,90 ±6,60	371,00 ±80,35	—	—
B	156,20 ±17,86	401,67 ± 45,86	—	—
C	157,06 ± 12,20	305,60 ±74,76 <sup>1</sup>	152,30 ±12,20	298,60 ± 33,17
D	146,09 ±14,70	372,00 ±6621	172,90 ± 8,77	267,10 ±48,18 <sup>2</sup>

1- Significante em relação aos normais dos demais grupos

2- Significante em relação ao normal do mesmo grupo

Valores estatisticamente significantes a nível de 5 % através do teste "t" de Student..

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

### 3.2- Período de desenvolvimento dos carcinomas

A tabela 5 mostra o período (dias) de desenvolvimento de carcinomas na boca nos diferentes grupos. Entre os ratos normais, o período foi semelhante. Os ratos sialoadenectomizados desenvolveram carcinomas num período estatisticamente menor que os ratos normais.

Tabela 5 - Média e desvio padrão do período (dias) necessário para o desenvolvimento de carcinomas de boca, após aplicação de 4-NQO associado ou não a *C. albicans*.

GRUPO	NORMAL	SIALOADENECTOMIZADO
A (n=10)	334,40±72,83	—
B (n=15)	328,60±74,97	—
C (n=5)	316,60±26,24	247,40±35,14*
D (n=10)	303,80±44,30	216,20±20,05*

\* - Valores estatisticamente significante a nível de 1%, através do teste "t" de Student em relação aos normais do mesmo grupo.

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

### 3.3 - Distribuição dos carcinomas na cavidade bucal

Todos os animais foram sacrificados quando apresentaram carcinoma na boca, principalmente no palato e na língua. Carcinomas ocorreram também no palato mole e mandíbula. Alguns animais apresentaram carcinomas em mais de um sítio da cavidade bucal. A porcentagem de animais normais e sialoadenectomizados e os sítios

da cavidade bucal que apresentaram carcinomas estão mostrados na tabela 6. A incidência de carcinoma de língua e palato foi semelhante, exceto no grupo D, no qual 90% dos ratos sialoadenectomizados apresentaram carcinoma de língua e 10% de palato, enquanto 30 e 80% dos ratos normais desenvolveram carcinoma de língua e palato respectivamente. Carcinoma de palato mole ocorreu apenas nos ratos do grupo C, pincelados com 4-NQO continuamente até a formação de carcinomas. Este grupo também apresentou maior incidência de carcinoma de mandíbula (40% dos ratos).

Tabela 6 - Carcinoma na boca de rato tratado com 4-NQO associados ou não com *C. albicans*. Valores em porcentagem (%).

GRUPO \ SÍTIO	NORMAL				SIALOADENECTOMIZADO			
	PALATO DURO	LÍNGUA	PALATO MOLE	MANDÍBULA	PALATO DURO	LÍNGUA	PALATO MOLE	MANDÍBULA
A (n=10)	40,0	50,0	—	10,0	—	—	—	—
B (n=15)	66,6	53,3	—	6,6	—	—	—	—
C (n=5)	40,0	60,0	20,0	—	60,0	40,0	20,0	40,0
D (n=10)	80,0	30,0	—	10,0	10,0	90,0	—	—

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

Os carcinomas de palato duro caracterizavam-se macroscopicamente por nódulos delimitados por bordas elevadas e esbranquiçadas e superfície ulcerada e necrosada; com localização predominantemente unilateral ao redor dos dentes molares,

eventualmente causando mobilidade dental. As lesões mostraram expansão predominantemente para a face palatina dos molares, atingindo por vezes toda a superfície intermolar. Os carcinomas de mandíbula apresentaram aspecto clínico semelhante ao observado na maxila e foram acompanhados de formação de abscesso na região cervical. Microscopicamente observou-se proliferação das células epiteliais pela lâmina própria, com a presença de ilhas de células epiteliais atípicas invadindo os tecidos subjacentes. Células neoplásicas estavam presentes próximas às trabéculas ósseas em regiões onde observou-se reabsorção do tecido ósseo. Observou-se ainda a presença de células tumorais invadindo ou circundando nervos, e periápice dental. Os carcinomas apresentaram-se altamente diferenciados com intensa formação de pérolas córneas. Áreas de necrose e infiltrado inflamatório polimorfonuclear foram frequentes. O epitélio adjacente aos carcinomas mostrou-se hiperqueratótico, acantótico e por vezes displásico.

Na língua, os carcinomas ocorreram na região do tubérculo intermolar. Um rato sialoadenectomizado tratado com 4-NQO e *C. albicans*, desenvolveu carcinoma também na porção anterior da língua. No tubérculo intermolar, as lesões ocorreram predominantemente no dorso, entretanto em dois animais, observou-se a presença de duas lesões distintas, uma no dorso e outra na borda lateral da língua.

Macroscopicamente, os carcinomas caracterizavam-se por nódulos delimitados por bordas elevadas e esbranquiçadas, com superfície ulcerada e necrosada ou, mais raramente, superfície papilomatosa. Por vezes as lesões apresentaram aspecto difuso, com superfície altamente papilomatosa, atingindo a região faríngea da língua. Histologicamente, os carcinomas caracterizaram-se por úlceras com proliferação de células epiteliais pela lâmina própria. Ilhas de células epiteliais foram observadas invadindo quase todo o tecido muscular e por vezes os ácinos das glândulas mucosas e serosas presentes no tubérculo intermolar e região faríngea da língua. Observou-se ainda a presença de extensas áreas de necrose e abundante infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Na maioria dos casos, os carcinomas de células escamosas apresentaram alto grau de diferenciação celular, com abundante formação de pérolas de queratina.

Nos carcinomas indiferenciados, observou-se a presença de células epiteliais mais anaplásicas; numerosas células gigantes multinucleadas; pleomorfismo nuclear e abundantes figuras de mitose atípicas. Adjacente aos carcinomas, o epitélio estava acantótico, hiperqueratótico, com hiperplasia da camada basal e com a presença de células inflamatórias. Próximo aos carcinomas, observou-se ainda áreas com graus variados de displasia epitelial e papilomas.

No palato mole, os carcinomas consistiram de nódulos com crescimento exofítico e superfície papilomatosa, atingindo por vezes toda a extensão do palato. Histologicamente, os carcinomas de células escamosas eram altamente diferenciados, com produção abundante de queratina.

Além dos carcinomas, foram observadas outras alterações no palato duro, língua e palato mole, mostradas nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Número médio por grupo, das alterações observadas no palato. Entre parênteses encontra-se a porcentagem de animais que apresentavam alterações no palato, além de carcinoma bucal.

GRUPO	NORMAL				SIALOADENECTOMIZADO	
	A (n=10)	B (n=15)	C (n=5)	D (n=10)	C (n=5)	D (n=10)
PROJEÇÃO EPITELIAL	5(30)	22(40)	4(20)	6(50)	3(20)	2(10)
PAPILOMA	10(60)	6(27)	4(20)	6(50)	3(20)	1(10)

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

Perda de definição das rugosidades palatinas e áreas de retração gengival foram encontradas 100% dos animais, exceto no grupo B, no qual foram observadas em 67% dos ratos. Projeções epiteliais e papilomas foram mais frequentes e atingiram maior número de ratos normais.

Microscopicamente, a mucosa palatina exibiu áreas de hiperqueratose e acantose, com aplainamento das rugosidades palatinas e projeções epiteliais papilomatosas irrigadas por estroma de fina camada de tecido conjuntivo. Estas alterações correspondem ao aspecto macroscópico de perda de definição das rugosidades palatinas, projeções epiteliais e papilomas. Observou-se ainda áreas de disqueratose focal acantolítica, com a presença de fendas suprabasais, células acantolíticas e disqueratóticas e hiperqueratose. Estas alterações não apresentaram correlação com as alterações macroscópicas na mucosa palatina. O epitélio apresentou ainda regiões com graus variados de displasia epitelial.

Tabela 8 - Número de alterações observadas macroscopicamente na língua dos animais. Entre parênteses encontra-se a porcentagem de ratos que apresentavam alterações.

GRUPO	NORMAL				SIALOADENECTOMIZADO	
	A (n=10)	B (n=15)	C (n=5)	D (n=10)	C (n=5)	D (n=10)
ATOFIA DE PAPILAS	7(30)	9(60)	7(60)	—	—	—
LEUCOPLASIA	18(70)	37(67)	8(40)	29(70)	22(60)	4(40)
PROJEÇÃO EPITELIAL	3(20)	7(27)	—	6(30)	3(60)	6(20)
PAPILOMA	1(10)	8(33)	1(20)	8(20)	7(60)	5(30)
ÚLCERA	1(10)	—	—	—	—	—
NÓDULO	1(10)	2(13)	—	—	—	—

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

A alteração mais frequente observada na língua dos ratos normais e sialoadenectomizados foi a presença de áreas leucoplásicas medindo entre 2 e 4 mm de diâmetro, entre áreas de atrofia de papilas, conferindo um aspecto granuloso ao tubérculo intermolar. Maior número de leucoplasia foi observado nos animais do grupo B, pincelados com 4-NQO durante 5 meses e a seguir inoculados com *C. albicans* e nos ratos normais do grupo D, tratados com 4-NQO e *C. albicans* até a formação de carcinomas.

Projeções epiteliais e papilomas ocorreram em baixa frequência e num número reduzido de animais em todos os grupos experimentais, exceto nos ratos sialoadenectomizados do grupo C, pincelados com 4-NQO até o desenvolvimento de carcinomas, onde estavam presentes em 60% dos animais e em apenas 20% dos ratos normais. Um nódulo delimitado por bordas elevadas e esbranquiçadas, e porção central ulcerada (úlceras), com cerca de 4mm de diâmetro e outro com superfície papilomatosa de cerca de 5mm de diâmetro, foram encontrados em um animal do grupo A. Em dois animais do grupo B foram observados dois nódulos com aspecto papilomatoso de cerca de 4 mm de diâmetro.

Histologicamente, nas áreas de leucoplasia observou-se epitélio acantótico, hiperqueratótico, com aplainamento das papilas linguais. Por vezes, a camada de queratina mostrou-se aumentada, descamando-se das demais camadas do epitélio, sem perda das projeções papilares.

A lesão ulcerada observada no animal do grupo A, consistiu de carcinoma de células escamosas superficialmente invasivo. O epitélio pavimentoso estratificado apresentou-se hiperqueratótico, acantótico, com a presença de células apresentando

queratinização individual ou início de formação de pérolas córneas, pleomorfismo nuclear, picnose, hipercromatismo e figuras de mitose em número aumentado. Em algumas áreas, o limite entre as células epiteliais e a lâmina própria era pouco perceptível.

Áreas com graus variados de displasia epitelial, disqueratose focal acantolítica e projeções epiteliais papilomatosas foram frequentemente observadas, tanto nos ratos normais quanto nos sialoadenectomizados.

Tabela 9 - Número médio por grupo de alterações do palato mole. Entre parênteses encontra-se a porcentagem de animais que apresentavam alterações.

ALTERAÇÃO \ GRUPO	NORMAL				SIALOADENECTOMIZADO	
	A (n=10)	B (n=15)	C (n=5)	D (n=10)	C (n=5)	D (n=10)
LEUCOPLASIA	3(20)	18(47)	—	5(20)	7(80)	18(80)
PROJEÇÃO EPITELIAL	1(10)	—	—	—	3(20)	2(10)
PAPILOMA	1(10)	1(7)	7(80)	6(30)	5(40)	2(20)
ÚLCERA	1(10)	1(7)	—	—	—	—
NÓDULO	—	—	—	1(10)	—	—

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma



Áreas leucoplásicas foram observadas em 80% dos ratos sialoadenectomizados dos grupos C e D. Entre os animais normais, maior incidência foi observada no grupo B, porém em apenas 47% dos animais. Papilomas foram infreqüentes e observados em número reduzido de animais, exceto no grupo C, no qual 80% dos ratos normais e 40% dos sialoadenectomizados apresentavam papilomas no palato mole.

Nos dos grupos A , B e D, observou-se ainda a presença de uma úlcera e nódulo. A lesão ulcerada apresentou cerca de 4 mm de diâmetro, crescimento exofítico, delimitado por bordas elevadas e esbranquiçadas e superfície deprimida e necrosada. Microscopicamente, observou-se a presença de carcinoma de células escamosas superficialmente invasivos. Os nódulos caracterizavam -se histologicamente por carcinomas de células escamosas invasivos e bem diferenciados.

As áreas leucoplásicas apresentavam cerca de 2 a 4 mm de diâmetro, distribuídas sobre a superfície do palato mole. Histologicamente observou-se epitélio hiperqueratótico e acantótico, com hiperplasia da camada basal. Projeções epiteliais papilomatosas e áreas com displasia epitelial de graus variados também estavam presentes.

### 3.4- Recuperação de *C. albicans*

Apenas os grupos B e D receberam tratamento com *C. albicans*. Após 24 horas da última inoculação de *C. albicans*, os ratos do grupo B apresentaram uma média de  $160,35 \times 10^4 \pm 180,00$  UFC/ml. No grupo D, os valores foram de  $2,21 \times 10^4 \pm 4,66$  para os ratos sialoadenectomizados e  $0,65 \times 10^4 \pm 0,65$  para os normais. Os valores do grupo D não foram significantes a nível de 5% pelo teste "t" de Student (Tabela 10).

### 3.5 - Candidose

Candidose no dorso da língua ocorreu principalmente no tubérculo intermolar, como pode ser observado na tabela 11. Foram mais frequentes nos animais do grupo B, nos quais observou-se 22 áreas de candidose. Das 22 áreas, seis foram encontradas em carcinomas, dez na superfície epitelial adjacente aos carcinomas e seis em regiões sem carcinoma. Nos carcinomas a colonização por *C. albicans* foi observada predominantemente na superfície da lesão. Eventualmente, o interior dos carcinomas mostrou invasão pela levedura. A presença de intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear, com formação de microabcessos intraepiteliais foi constantemente observada nas áreas de candidose. Nas áreas de candidose presentes no epitélio adjacente aos carcinomas e nas regiões sem carcinoma, o epitélio apresentou-se hiperqueratótico, acantótico e por vezes displásico, com aplainamento das papilas linguais e infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

No palato foram observadas 16 áreas de candidose em 46,6% dos ratos deste grupo. Cinco na superfície de carcinomas, quatro na superfície do epitélio adjacente aos carcinomas e seis em regiões sem carcinoma. Nos carcinomas, a colonização por *C. albicans* ocorreu predominantemente na superfície das lesões. A invasão por *Candida* ocorreu apenas na camada queratinizada do epitélio, o qual apresentou hiperqueratose, o epitélio apresentou hiperqueratose, acantose e grau variado de displasia epitelial. Tanto nos carcinomas quanto na superfície epitelial ocorreu formação de microabcessos intraepiteliais

No grupo D, 30% dos ratos normais e 40% dos sialoadenectomizados apresentaram candidose, com um total de 3 e 11 áreas. Nos ratos normais, as áreas de candidose ocorreram na superfície queratinizada do epitélio. Nos ratos sialoadenectomizados, 5 áreas de candidose foram encontradas em carcinomas e 6 na superfície epitelial adjacente aos carcinomas. O epitélio apresentou-se acantótico, hiperqueratótico, com aplainamento das papilas linguais e infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

No palato, doze áreas de candidose estavam presentes em 50% dos animais normais e dezesseis em 60% dos sialoadenectomizados. As áreas de candidose ocorreram predominantemente na gengiva aderida ao dente, onde o epitélio apresentou hiperqueratose, acantose, displasia e intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

Tabela 10 - Número de UFC/ml de *C. albicans* recuperado da cavidade bucal de ratos com carcinoma.

GRUPO	NORMAL	SIALOADENECTOMIZADO
B (n=15)	160,35x10 <sup>4</sup> ± 180,00*	—
D (n=10)	0,65x10 <sup>4</sup> ± 0,65	2,21x10 <sup>4</sup> ± 4,66

\* Significante em relação aos normais e sialoadenectomizados do grupo D. Teste "t" de Student a nível de 5%.

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

Tabela 11 - Número de áreas de candidose na língua e palato de ratos com carcinoma. Entre parênteses a porcentagem de animais com candidose.

GRUPO	SÍTIO	NORMAL			SIALOADENECTOMIZADO		
		TI	PCS	PALATO	TI	PCS	PALATO
B (n=15)		22(80)	4(27)	16(47)	—	—	—
D (n=10)		3(30)	0	12(50)	11(40)	0	16(60)

TI - Tubérculo intermolar

PCS - Papilas cônicas simples

B - 4-NQO 5 meses seguido de *C. albicans*

D - 4-NQO e *C. albicans* simultaneamente até a formação de carcinoma

#### 4 - ESTÔMAGO

Os ratos tratados com **C. albicans** durante 3 e 180 dias, assim como os ratos tratados com 4-NQO cinco meses e com **C. albicans** por 3 dias consecutivos não mostraram alterações do estômago.

Animais dos grupos A, B, C e D apresentaram no estômago, número variável de projeções papilomatosas na região cárdica (Tabela 12). Microscopicamente, estas projeções apresentavam hiperqueratose.

Tabela 12 - Porcentagem de ratos do grupo A, B, C e D com projeções papilomatosas no estômago.

QUANTIDADE DE PROJEÇÕES PAPILOMATOSAS	NORMAL				SIALOADENECTOMIZADO	
	A (n=10)	B (n=15)	C (n=5)	D (n=10)	C (n=5)	D (n=10)
Ausente	—	33,3	20	—	—	—
1 a 20	100	46,6	60	60	60	60
20 a 50	—	13,3	20	20	30	20
+ de 50	—	13,3	—	20	20	20

A - 4-NQO 5 meses

B - 4-NQO 5 meses seguido de **C. albicans**

C - 4-NQO até a formação de carcinoma

D - 4-NQO e **C. albicans** simultaneamente até a formação de carcinoma

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Após 180 dias de inoculação de *C. albicans*, os animais não apresentaram sinais de distúrbios locais ou sistêmicos, com ganho de peso gradual durante todo o período experimental. Os ratos normais pincelados com 4-NQO no palato apresentaram sinais de debilidade física, caracterizada por perda acentuada de peso, prostração, dificuldade de deglutição e falta de asseio corporal após o estabelecimento de tumores malignos na cavidade bucal, provavelmente em decorrência da dificuldade na alimentação provocada pelas ulcerações, o que também foi observado por WALLENIUS, 1966; LEKHOLM e WALLENIUS, 1976; STLEIDER e READE, 1984). O mesmo foi observado para os ratos xerostômicos, embora por vezes observou-se que o estado de debilidade física não era acompanhado pela progressão das lesões bucais, sugerindo maior susceptibilidade de alguns animais à presença de lesões na cavidade bucal.

A xerostomia por si ou a inoculação prolongada de *C. albicans* parece não interferir no desenvolvimento dos animais. Segundo JORGE (1991), ratos normais e sialoadenectomizados inoculados com *C. albicans* durante 32 semanas, não apresentaram sinais de debilidade física e ao final do experimento, a média de peso corporal final foi semelhante.

Neste estudo, o peso corporal final dos ratos sialoadenectomizados foi estatisticamente menor que dos ratos normais, sugerindo menor resistência dos ratos xerostômicos à presença das ulcerações bucais provocadas pelo 4-NQO.

Optou-se neste trabalho pela obtenção da xerostomia através da sialoadenectomia por ser um método simples, que mantém permanente a redução do fluxo salivar. O uso de agentes químicos pode provocar efeitos colaterais, induzir resistência nos animais, além do seu efeito transitório poder influenciar nos resultados (WALLENIUS, 1966; LEKHOLM e WALLENIUS, 1976).

Considerando a aplicação de *C. albicans* por 3 dias consecutivos como período curto e por seis meses como prolongada, os dados obtidos indicam maior recuperação da levedura após período curto de aplicação. A mesma observação é válida para a presença de candidose, mais frequente após inoculação por 3 dias. Estes dados podem ser explicados pela possível resposta imune, com conseqüente presença de maior quantidade de IgA anti-*Candida* na saliva dos ratos inoculados por seis meses. É interessante também que após o tratamento com 4-NQO por 5 meses e aplicação de *C. albicans* por três dias, a incidência de candidose foi maior do que em ratos normais tratados só com *C. albicans*. Além disto, a candidose estabeleceu-se principalmente nas áreas de hiperqueratose, indicando uma infecção secundária à alteração epitelial.

Numerosos fatores estão envolvidos na permanência e colonização da mucosa bucal por *C. albicans*. A aderência dos microrganismos às células epiteliais constitui o primeiro passo para que ocorra a colonização do tecido e posterior desenvolvimento de infecção (GIBBONS e van HOUTE, 1971, 1975; MARDT e WESTRON, 1976; KIMURA e PEARSAL, 1978). A baixa incidência de candidose nos ratos normais deve-se provavelmente à presença dos mecanismos de defesa de primeira linha presentes na saliva. A IgA salivar inibe a adesão de *C. albicans* às células epiteliais bucais (EPSTEIN e cols., 1982; VUDHICHAMNONG e cols., 1982). A importância da saliva no controle de infecção por *Candida* na cavidade bucal é demonstrada experimentalmente em vários modelos animais. Macacos cuja redução do fluxo salivar foi obtida com injeções de oxifenciclimina, apresentaram lesões no palato mais extensas e de regressão mais lenta após uma semana de uso de placa acrílica inoculada com *C. albicans*, em relação aos animais com o fluxo salivar intacto (OLSEN e HAANES, 1977). Maior número de leveduras aderidas à mucosa bucal e do esôfago foi observado em ratos com o fluxo salivar reduzido (MEITNER e cols., 1990).

A permanência de *C. albicans* na cavidade bucal de ratos submetidos à sialoadenectomia, foi estudada por JORGE (1991). Após a inoculação de  $10^8$  células da levedura por 3 dias consecutivos, *C. albicans* foi recuperada em maior quantidade e persistência da cavidade bucal dos animais sialoadenectomizados. Resultados semelhantes foram obtidos por TOTTI (1994), após 4 inoculações de *C. albicans*, sendo a quantidade de leveduras maior nos ratos sialoadenectomizados, até 30 dias após a última inoculação.

O número de leveduras recuperados da cavidade bucal dos ratos pincelados com 4-NQO por 5 meses e inoculados com **C. albicans** por três dias consecutivos foi semelhante ao observado nos animais normais. A alta incidência de candidose nesses animais deve-se provavelmente à presença das alterações que desenvolveram-se na mucosa bucal em decorrência da aplicação do carcinógeno, favorecendo a aderência e posterior colonização da mucosa lingual. Alguns agentes químicos são responsáveis pelo aumento na expressão de receptores de superfície nas células epiteliais para **C. albicans** (ROTROSEN e cols., 1986), podendo também ser este um mecanismo pelo qual a aplicação do 4-NQO favoreceu o desenvolvimento de candidose.

Os ratos inoculados com **C. albicans** durante seis meses apresentaram um número significativamente menor de leveduras na cavidade bucal, bem como redução acentuada no número de áreas de candidose na superfície da língua. Neste grupo apenas um animal apresentou uma área com a presença de duas pseudo-hifas e raros leucócitos polimorfonucleares. Nesta área, o epitélio apresentou-se hiperqueratótico com hiperplasia da camada basal, aplainamento das papilas gigantes e tecido conjuntivo hiper celularizado. O aspecto observado sugeriu resolução de infecção por **C. albicans** e desenvolvimento de resistência dos animais devido à inoculação prolongada. Estes dados estão de acordo com os observados por RUSSEL (1984), que descrevem o desenvolvimento de resistência dos animais após longos períodos de inoculação.

FISKER (1990) encontrou candidose em apenas 25% dos ratos submetidos à tratamento prévio com tetraciclina e inoculados semanalmente com **C. albicans** durante 34 semanas. Áreas com sinais de infecção crônica por **Candida**, com a presença de epitélio hiperqueratótico, acantótico com hiperplasia da camada basal, com a presença ou não de pseudohifas no interior da queratinas foram frequentes.

A resposta do organismo frente à infecção por **Candida** pode ser específica ou inespecífica. As leveduras são prontamente fagocitadas pelos granulócitos, sendo a fagocitose aumentada na presença de anticorpos e complemento (PEREIRA e HOSKING, 1984). Estudos têm demonstrado que indivíduos com neutropenia ou defeitos nas funções dos neutrófilos possuem alta susceptibilidade à infecções por **Candida**. A resistência ou susceptibilidade de animais experimentais à candidose é mediada principalmente por



neutrófilos. Estudando a resposta mediada por células, SALVIN e cols. (1985) observaram que camundongos submetidos à timectomia neonatal apresentam maior susceptibilidade à infecção por **Candida**. A alta frequência de candidose em indivíduos com deficiência imunológica, como os portadores de AIDS ou transplantados demonstra claramente o papel da resistência do hospedeiro frente à infecção por **C. albicans** ( BARONE e cols., 1990; RAMÍRES e cols., 1990; ; MacCARTHY, 1992). Indivíduos HIV positivos portadores de **Candida** ou com candidose apresentam índices elevados de anticorpos anti-**Candida** no soro (WRAY e cols., 1990). Por outro lado, a IgA secretória apresenta capacidade de inibir a aderência de leveduras às células epiteliais bucais (EPSTEIN e cols., 1982).

A virulência do microrganismo também é relevante no desenvolvimento de infecção. A amostra de **C. albicans** utilizada neste estudo é produtora de enzimas histolíticas, proteinase, hialuronidase, fosfatase e condroitin-sulfatase e apresenta alta virulência para camundongos (SHIMIZU, 1990), o que provavelmente facilitou o desenvolvimento de infecção. A produção de enzimas histolíticas favorece a invasão e colonização do tecido pela levedura.

No presente estudo, com a aplicação concomitante de 4-NQO e **C. albicans** até a formação de carcinomas ocorreu redução acentuada do número de leveduras e candidose bucal nos ratos normais e sialoadenectomizados, sendo que nos sialoadenectomizados a quantidade de leveduras e candidose foi maior que nos ratos normais, porém sem diferença estatística.

Estudos preliminares demonstraram que ratos sialoadenectomizados apresentam quantidade significativamente maior de leveduras (UFC/ml) na cavidade bucal após três inoculações consecutivas de **C. albicans**. Os ratos tratados concomitantemente com 4-NQO e **C. albicans** foram recuperadas  $2,21 \times 10^4$  nos sialoadenectomizados e  $0,65 \times 10^4$  UFC/ml nos ratos normais. Três áreas de candidose foram observadas em 30% dos ratos normais e 11 em 40% dos sialoadenectomizados, sugerindo que a xerostomia favoreceu o desenvolvimento de candidose nos ratos deste grupo. Esses valores diferem significativamente dos encontrados nos ratos normais pincelados com 4-NQO no palato durante 5 meses e posteriormente inoculados com **C. albicans** até a formação de carcinomas bucais. A redução no número de leveduras da cavidade bucal dos ratos tratados concomitantemente com 4-NQO e **C. albicans**

deve-se provavelmente à ação fungicida do óxido de nitroquinolina para *Candida* e outras espécies de fungos (SAKAY e cols., 1957).

Embora a inoculação de *C. albicans* tenha sido realizada de 5 a 7 horas após a aplicação do carcinógeno, a presença de pequena quantidade do 4-NQO na mucosa bucal dos ratos provavelmente interferiu na colonização do epitélio por *C. albicans*. Experimentos prévios demonstraram que ratos normais e sialoadenectomizados submetidos à tratamento semelhante por seis meses e a seguir mantidos em observação, sem qualquer tratamento, até o desenvolvimento de carcinomas bucais apresentam maior número de áreas de candidose que os ratos tratados continuamente com 4-NQO e *C. albicans*. Estas observações sugerem também que a presença do 4-NQO inibe o crescimento de *C. albicans* também "in vivo".

A alta frequência leveduras e candidose bucal observada nos ratos pincelados com 4-NQO por cinco meses e posteriormente inoculados com *C. albicans* ocorreu provavelmente devido à presença das alterações epiteliais provocadas pelo carcinógeno, favorecendo maior retenção e facilitando a aderência e colonização pela levedura. Estudos semelhantes não foram encontrados na literatura e novos experimentos estão sendo realizados para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de candidose em alterações epiteliais causadas pela aplicação do 4-NQO.

Neste estudo observou-se que tanto os ratos normais quanto nos sialoadenectomizados inoculados com *C. albicans* apresentaram maior número de áreas de candidose na porção anterior da língua enquanto que nos animais pincelados com 4-NQO no palato, ocorreu inversão, e um número significativamente maior de áreas com a presença de pseudo-hifas no interior do epitélio foi observado na região do tubérculo intermolar.

Observou-se ainda que após a aplicação concomitante de 4-NQO e *C. albicans*, áreas de candidose foram encontradas apenas na região do tubérculo intermolar, exceto no animal que desenvolveu carcinoma na porção anterior da língua, sugerindo que as alterações epiteliais decorrentes da aplicação do 4-NQO favoreceram a colonização do tecido pela levedura, embora a infecção não tenha sido encontrada em 100% dos animais e a presença de pseudo-hifas não ter sido observada em todas as áreas do epitélio da língua que apresentaram hiperqueratose. Uma melhor caracterização quanto ao potencial carcinogênico da amostra utilizada e estudos comparativos com outras amostras de *C. albicans* e carcinogênese bucal,

são necessários para se relacionar a presença da levedura ao desenvolvimento de carcinomas, visto que a presença da *C. albicans* não interferiu no período de desenvolvimento dos carcinomas na cavidade bucal dos ratos normais e xerostômicos.

O papel da *C. albicans* na carcinogênese é controverso. O alto índice de transformação maligna de leucoplasias bucais infectadas por *Candida* em relação as leucoplasias não infectadas pela levedura; o potencial carcinogênico apresentado por alguns biotipos de *C. albicans* devido à produção de nitrosaminas endógenas; o aumento da permeabilidade da mucosa bucal a agentes químicos carcinogênicos ou não, sugere um papel ativo da *C. albicans* no desenvolvimento de carcinomas bucais, se não no processo de iniciação, provavelmente atuando como agente promotor da carcinogênese (PINDBORG e cols., 1963; CAWSON, 1966; SILVERMAN e ROSEN, 1968; ROED-PETERSEN, 1971; HSIA e cols., 1981; KROGH e cols., 1987; KROGH, 1990).

A invasão dos carcinomas por pseudo-hifas de *C. albicans* foi raramente observada, mesmo naqueles que apresentavam produção exuberante de queratina na forma de pérolas córneas. A baixa frequência de invasão de carcinomas por *C. albicans* e a alta frequência em leucoplasias bucais foi descrita por CAWSON (1966) em biópsias de pacientes com leucoplasias e carcinomas bucais.

Na recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos ratos normais e sialoadenectomizados, observou-se variação individual na quantidade de levedura recuperada da cavidade bucal dos animais. Essa variação individual, bem como a variação apresentada na recuperação da levedura da cavidade bucal em diferentes períodos do dia e em dias diferentes é relatada em animais e humanos. LILIENTHAL (1950) observou variação na presença de *C. albicans* na boca de indivíduos normais, caracterizando a levedura como microrganismo transitório. GERGELI e URI (1966) estudaram a variação diária de fungos na cavidade bucal durante oito dias e encontraram resultados variáveis no mesmo indivíduo. Muitos fatores devem contribuir para alterar as condições do meio bucal e nessas condições, *Candida* pode ou não ser isolada da boca no momento da coleta. A presença da microbiota comensal, tamanho, viabilidade e quantidade de receptores de membrana nas células bucais e métodos utilizados para a coleta parecem interferir na recuperação experimental de leveduras da cavidade bucal (CORMANE e GOSSLINGS, 1963; SANDIN e cols., 1987). Neste trabalho,

a mesma metodologia foi empregada na recuperação e cultivo de *C. albicans* da cavidade bucal de todos os animais, assim a variabilidade encontrada provavelmente não foi devido à metodologia.

Para o estudo em carcinogênese bucal, o modelo utilizado neste trabalho foi preconizado por WALLENIOUS (1973), e sua eficácia na indução de carcinomas bucais em ratos tem sido relatada em vários estudos (WONG e WILSON, 1983; STLEIDER e READE, 1984; FISKER e cols., 1990). Neste modelo o agente carcinogênico 4-NQO é pincelado no palato de ratos três vezes por semana, resultando no desenvolvimento de carcinomas num período de 7 meses. A maioria dos estudos em carcinogênese bucal utiliza os ratos Sprague-Dawley, entretanto, os ratos da variedade Wistar são os mais comuns em nosso meio, motivo pelo qual foi utilizado neste trabalho. Os ratos Wistar são menores, o que facilita o seu manuseio; apresentam maior longevidade e menor índice de doenças intercorrentes que os ratos Sprague-Dawley (FISKER e cols., 1990). A indução de carcinomas na cavidade bucal através de carcinógenos químicos está relacionada à fatores tais como susceptibilidade das espécies aos diferentes carcinógenos utilizados; tipo de carcinógeno empregado e susceptibilidade dos diferentes sítios da cavidade bucal e, maior resistência apresentada pela mucosa bucal aos carcinógenos químicos. WALLENIOUS (1965) demonstrou que a aplicação de DMBA na mucosa bucal de ratos durante 16 semanas resultou no desenvolvimento de carcinomas em apenas 30% dos animais. Utilizando o 4-NQO, 100% dos animais apresentaram carcinomas após 7 meses de tratamento (WALLENIOUS e LEKHOLM, 1973). Segundo esses autores, a eficácia do 4-NQO frente ao DMBA na indução de carcinomas na cavidade bucal de ratos deve-se ao fato de que o 4-NQO é uma amina aromática hidrossolúvel e o DMBA é um hidrocarboneto aromático lipossolúvel. A hidrossolubilidade do 4-NQO facilitaria sua difusão pela película de saliva que recobre a cavidade bucal; enquanto o DMBA por ser lipossolúvel, seria facilmente deglutido, permanecendo pouco tempo em contato com a mucosa bucal.

Entretanto, EVESON e MacDONALD (1977), observaram que a língua do hamster é relativamente refratária à ação do 4-NQO, sugerindo que a diferença na susceptibilidade das espécies animais ou dos sítios da cavidade bucal, mais do que a hidro ou lipossolubilidade do carcinógeno é responsável pela eficácia do 4-NQO na indução de

carcinomas bucais em ratos. A diferença de susceptibilidade das espécies animais à agentes carcinogênicos foi relatada por COHEN e SMITH em 1967 após a aplicação de DMBA na mucosa bucal de macacos por um período de 4 anos, sem que qualquer alteração indicativa de malignidade fosse observada. Além disso, é relevante o tipo de epitélio, visto que o DMBA é bastante efetivo no epitélio da bolsa da bochecha de hamsters, na qual existem apenas 3 ou 4 camadas de células, o epitélio não é queratinizado e tem como propriedade a absorção de substâncias químicas (SALLEY, 1954; WHITE e cols., 1981), enquanto o epitélio da mucosa de ratos é pavimentoso estratificado ortoqueratinizado.

A sialoadenectomia provocou uma redução em cerca de 80% do volume salivar, como também observado por ITO (1990) e TOTTI (1994). Em humanos, a redução em 40 a 50% do volume total da saliva é indicativa de xerostomia (FOX e cols., 1985; DAWES, 1987; MANDEL, 1980). Após a cirurgia, os animais apresentaram a mucosa bucal bastante seca, apenas com a presença de saliva residual, provavelmente proveniente das glândulas salivares menores localizadas por toda a cavidade bucal.

A xerostomia constitui um dos mais importantes fatores locais predisponentes à alterações na cavidade bucal, devido à diminuição do fluxo salivar, responsável pela manutenção do equilíbrio microbiológico, na fisiologia orofaríngea, na digestão e proteção das células gástricas (MANDEL, 1987; HERRERA e cols., 1988). O período de desenvolvimento de carcinomas nos ratos com redução do fluxo salivar através da sialoadenectomia foi de aproximadamente de 240 dias; significativamente inferior ao período de 322 dias observados para os animais com o fluxo salivar intacto. O mesmo foi observado por WALLENIUS e LEKHOLM (1973) em ratos cuja xerostomia foi obtida mediante o uso de metilescopolamina. Após 5 meses de aplicação de 4-NQO, todos os animais apresentaram carcinomas na cavidade bucal, período significativamente inferior ao descrito para animais normais pelos mesmos autores. O efeito protetor da saliva foi demonstrado por LEKHOLM e WALLENIUS (1976) na indução de carcinoma epidermóide na orelha de ratos. Quando a aplicação do DMBA foi realizada sobre uma camada de saliva, os carcinomas desenvolveram-se num período 30% maior que os animais que não receberam aplicação prévia de saliva.

O 4-NQO aplicado por cinco meses ou continuamente provavelmente atuou como agente iniciador e promotor da carcinogênese, visto que o agente promotor pode

ser o próprio carcinógeno ou qualquer agente inespecífico (BEREBLUN e SHUBIK, 1947; BECKER, 1981). O desenvolvimento de carcinomas ocorreu em 100% dos animais pincelados com 4-NQO durante cinco meses ou continuamente num período semelhante de tempo.

A frequência de aplicação do carcinógeno é relevante e está relacionada com o período de expectativa para o desenvolvimento de carcinomas na cavidade bucal (SVENSON e HEYDEN, 1982; WONG e WILSON, 1983; STEIDLER e READE, 1984; RICH e READE, 1988; FISHER, 1990). Neste estudo observou-se que a aplicação de 4-NQO no palato por cinco meses resultou no desenvolvimento de carcinomas em 100% dos animais, num período semelhante ao encontrado nos animais pincelados continuamente com o 4-NQO até a formação de carcinomas, tanto nos ratos normais quanto nos sialoadenectomizados, sugerindo que com cinco meses de tratamento, a dose de carcinógeno aplicada foi suficiente para promover a iniciação e promoção do processo de carcinogênese, não sendo necessário o estímulo constante do carcinógeno. Em camundongos pincelados com 4-NQO no palato por 2, 4, 6, 8, 12, 16 semanas, STLEIDER e READE (1984) observaram que a incidência de carcinomas de células escamosas de palato cresceu de acordo com o aumento no período de aplicação do carcinógeno e que após 50 semanas atingiu 100% dos animais apenas no grupo pincelado durante dezesseis semanas. Quando submetidos à três e seis aplicações de 4-NQO no palato, apenas um rato apresentou carcinoma no sítio de aplicação do carcinógeno após 80 semanas de expectativa; entretanto quando o carcinógeno foi aplicado por vinte a vinte e duas semanas, 100% dos animais desenvolveram carcinomas em apenas oito semanas.

As primeiras alterações observadas clinicamente na mucosa palatina dos animais ocorreram após dois meses de aplicação do 4-NQO e caracterizaram-se por aspecto esbranquiçado e perda de definição das rugosidades palatinas presentes na região intermolar. No decorrer do tratamento, a mucosa do palato apresentou aspecto papilomatoso e ulceração deformante, com eventual mobilidade dental. A progressão das alterações observadas neste estudo foram descritas por WALLENUS (1966); WALLENUS e LEKHOLM (1973); LEKHOLM e WALLENUS (1976); SVENSON e HEYDEN (1982), os quais descrevem a presença de reações inflamatórias precoces, leucoplasias seguidas por numerosos crescimentos papilares e irregulares no palato e áreas tumorais adjacente aos dentes molares.

As alterações ocorreram mais precocemente no palato dos ratos xerostômicos, demonstrando assim a ação da saliva na proteção da cavidade bucal frente à carcinógenos químicos. A saliva não impede o desenvolvimento de carcinomas, visto que todos os animais com fluxo salivar normal desenvolveram carcinomas bucais, porém dificulta a ação do 4-NQO, retardando o aparecimento das neoplasias malignas. Os ratos sialoadenectomizados desenvolveram carcinomas mais precocemente provavelmente porque nesses animais as células normais foram iniciadas mais rapidamente que nos ratos normais.

Tanto nos ratos normais quanto nos xerostômicos, os carcinomas de palato caracterizaram-se macroscopicamente por nódulos delimitados por bordas elevadas e esbranquiçadas, com superfície necrosada e ulcerada, com localização predominantemente unilateral, ao redor dos dentes molares. As lesões apresentaram expansão tanto para a face vestibular quanto palatina dos dentes, por vezes comprometendo toda a superfície intermolar do palato. NAVARRO (1992) observou maior incidência de lesões mais severas e com localização bilateral no palato de ratos sialoadenectomizados após aplicação de 4-NQO no palato de ratos quatro vezes por semana durante seis meses. O mesmo não foi observado neste estudo, no qual o aspecto clínico dos carcinomas de palato foi semelhante entre os ratos normais e sialoadenectomizados. Essa diferença provavelmente deve-se ao período utilizado em cada experimento, pois também no presente estudo, com seis meses de tratamento, grande número de ratos xerostômicos apresentou alterações mais acentuadas que os ratos normais, incluindo a presença de carcinomas.

Além da presença dos carcinomas, ao término do experimento, a mucosa palatina apresentou aspecto altamente irregular, devido à presença de projeções epiteliais, papilomas e áreas de retração gengival. Na maioria dos estudos em carcinogênese, e também neste, as manifestações clínicas iniciais tanto de palato quanto de língua, eram de caráter exofítico, como por exemplo a presença de papilomas (STORMBY e WALLENIIUS, 1964; WALLENIIUS, 1966; LEKHOLM e WALLENIIUS, 1976; MAREFAT e cols, 1979; WHITE e cols., 1981; WONG e WILSON, 1983). As áreas de retração gengival provavelmente constituem o início do desenvolvimento dos carcinomas, visto que os carcinomas ocorrem predominantemente ao redor dos dentes molares, expandindo-se a seguir para as faces palatina e vestibular dos dentes. O número de papilomas e projeções epiteliais foi semelhante nos

ratos normais e sialoadenectomizados. Entretanto a quantificação das alterações nos animais portadores de carcinoma de palato fica comprometida devido ao desenvolvimento das ulcerações, porém ilustram a frequência e o número de alterações na mucosa palatina decorrente da aplicação do 4-NQO.

A língua constituiu o segundo sítio no qual as alterações epiteliais foram observadas com maior frequência. As alterações epiteliais ocorrem basicamente na região do tubérculo intermolar, devido ao intenso contato dessa região com a região intermolar do palato, durante os movimentos fisiológicos (KUTUZOV e SICHER, 1951, 1952; MATTHEUS e cols., 1986). Alterações na porção anterior da língua foram infrequentes e ocorreram apenas nos animais sialoadenectomizados. Nesta região observou-se a presença de áreas leucoplásicas, atrofia das papilas linguais, edema e a presença de carcinoma em um rato. O desenvolvimento de carcinomas na porção anterior da língua é raro, sendo necessário o uso de agentes promotores potentes ou a aplicação do carcinógeno sobre superfícies submetidas à traumas ou escoriações frequentes (FUJITA e cols, 1973; MAEDA e KAMEYAMA, 1986). A maior resistência observada na porção anterior da língua deve-se provavelmente à presença de espaços interpapilares pronunciados na região das papilas cônicas simples, os quais são recobertos por queratina mecanicamente mais resistente do que aquela que recobre a extremidade das papilas. Na região do tubérculo intermolar, as papilas filiformes verdadeiras e gigantes estão distribuídas muito próximas umas das outras, conseqüentemente apresentam espaços interpapilares reduzidos, além de apresentarem a camada de queratina com composição diferente daquela encontrada nos espaços interpapilares (KUTUZOV e SICHER, 1951).

As alterações na região do tubérculo intermolar ocorreram simultaneamente às observadas no palato. As primeiras alterações causadas pela aplicação do 4-NQO no palato caracterizaram-se pela presença de áreas leucoplásicas e regiões com atrofia das papilas linguais, com evolução eventual para papilomas, conferindo à região do tubérculo intermolar um aspecto nodular, como também observado por STEIDLER e READE (1984) após oito semanas de aplicação de 4-NQO no palato de camundongos. Essas foram as únicas alterações observadas nos animais normais mortos com cinco meses de aplicação do 4-NQO. Com o decorrer do experimento, provavelmente em virtude da falta de vascularização adequada, os



papilomas sofriam necrose, originando pequenas ulcerações delimitadas por bordas elevadas e esbranquiçadas e porção central deprimida, evoluindo para ulcerações com leito exofítico, superfície vegetante com projeções digitiformes. Essa sequência de alterações foi relatada por vários autores (WALLENIOUS e LEKHOLM, 1973; LEKHOLM e WALLENIOUS, 1976; WALLENIOUS e cols., 1979.; STEIDLER e READE, 1984; PRIME e cols., 1986 b).

Neste estudo observou-se que a incidência de carcinomas de língua foi tão alta quanto de palato, sendo superior nos ratos sialoadenectomizados submetidos à aplicação concomitante de 4-NQO e *C. albicans* por cinco meses ou até o desenvolvimento de carcinomas. A alta incidência de carcinomas na região do tubérculo intermolar, neste trabalho observada principalmente nos ratos xerostômicos, deve-se provavelmente ao intenso contato desta região com a região intermolar do palato (KUTUZOV e SICHER, 1951, 1952; MATTHEWS e cols., 1986). Nos ratos sialoadenectomizados tratados concomitantemente com 4-NQO e *C. albicans* (Grupo D), 90% dos carcinomas ocorreram na língua. Seria de se supor que a presença de *C. albicans* favoreceu o processo de carcinogênese na língua, mas o conjunto de dados não são claros para uma afirmação desta natureza.

Além do palato e língua, alterações epiteliais, incluindo carcinomas foram observadas no palato mole e na mandíbula dos animais. No palato mole os carcinomas caracterizaram-se macroscopicamente por nódulos delimitados por bordas elevadas e esbranquiçadas e superfície papilomatosa, atingindo por vezes toda a superfície do palato mole. A frequência de alterações como leucoplasias e papilomas foi maior nos ratos xerostômicos, entretanto os carcinomas desenvolveram-se apenas nos ratos normais, demonstrando que o contato do carcinógeno com a mucosa é importante no desenvolvimento de carcinomas de palato mole. O estado de xerostomia não facilitou o desenvolvimento de carcinomas nessa região. Carcinomas de mandíbula foram observados num número reduzido de animais, não ocorrendo predominância entre os ratos normais e sialoadenectomizados. Os carcinomas neste sítio apresentaram aspecto clínico semelhante ao observado na maxila. Caracterizaram-se por nódulos delimitados por bordas elevadas e esbranquiçadas, com superfície necrosada e ulcerada, localizados unilateralmente ao redor dos dentes molares, por vezes causando mobilidade dental. Os carcinomas de mandíbula eram frequentemente acompanhados pela formação de abscessos na região cervical. Carcinomas de mandíbula

também foram encontrados em 25% dos ratos com fluxo salivar intacto pincelados com 4-NQO no palato (WALLENIOUS e LEKHOLM, 1976).

Assim como na boca, o 4-NQO não induz alterações no estômago quando aplicado por cinco meses, mas causa formação de projeções papilomatosas posteriormente. Os dados indicam que as lesões são mais numerosas quando o 4-NQO é aplicado continuamente na boca até a formação de carcinoma, do que por apenas cinco meses. As alterações na mucosa gástrica caracterizaram-se por projeções epiteliais de diâmetros variados. Por vezes os animais xerostômicos apresentaram maior frequência de alterações, provavelmente devido à deglutição do 4-NQO sem a diluição pela saliva. A importância da frequência de administração da diluição do carcinógeno pode ser demonstrada pela ausência de quaisquer alterações no estômago dos ratos normais mortos após cinco meses de aplicação do 4-NQO. Apenas um animal desenvolveu carcinoma clinicamente diagnosticável no estômago (dado não apresentado neste trabalho). O estômago apresentou tamanho quatro a cinco vezes maior que o normal, com superfície totalmente irregular, devido a presença de numerosas projeções papilomatosas. Histologicamente, observou-se carcinoma de células escamosas altamente diferenciado, com abundante formação de pérolas de queratina e infiltrado inflamatório polimorfonuclear. O carcinoma de estômago ocorreu em um rato normal submetido à aplicação concomitante de 4-NQO por seis meses e mantido em observação até o desenvolvimento de carcinomas na cavidade bucal. Infecção por **Candida** não foi observada. Alterações de estômago, incluindo a presença de carcinomas foi observada em outros trabalhos (WALLENIOUS, 1966; WALLENIOUS e LEKHOLM, 1973; STEIDLER e READE, 1984; NAVARRO, 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o efeito protetor na cavidade bucal exercido pela saliva frente à carcinógenos químicos, não impedindo, porém retardando o desenvolvimento de carcinomas bucais induzidos pela aplicação do 4-NQO. Observações semelhantes também foram relatadas por WALLENIOUS, 1966; LEKHOLM e WALLENIOUS, 1973). A inoculação de **C. albicans** não favoreceu o desenvolvimento de carcinomas bucais. A aplicação de 4-NQO parece ter favorecido a permanência e colonização da mucosa bucal por **C. albicans**, entretanto novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos implicados.

## CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

- 1 - Ratos sialoadenectomizados pincelados com 4-NQO no palato desenvolveram carcinomas bucais num período inferior aos normais.
- 2 - Ratos pincelados com 4-NQO no palato durante cinco meses e mantidos em observação até a formação de carcinomas, desenvolveram carcinomas bucais num período semelhante ao observado para os ratos pincelados continuamente com o carcinógeno.
- 3 - A inoculação de **C. albicans** não exerceu influência no período de desenvolvimento de carcinomas provocados pelo 4-NQO.
- 4 - Alterações epiteliais causadas pela aplicação de 4-NQO favoreceram, mais que a redução do fluxo salivar, a colonização do dorso da língua de ratos por **C. albicans**.
- 5 - O 4-NQO parece inibir "in vivo" a permanência e colonização de **C. albicans** na cavidade bucal de ratos.
- 6 - A formação de projeções papilomatosas no estômago, assim como ocorre com os carcinomas de boca, se desenvolveram espontaneamente mesmo após o cessamento da aplicação do 4-NQO.

**RESUMO**

## RESUMO

Neste trabalho foram estudados os efeitos da sialoadenectomia e aplicação de *C. albicans* no desenvolvimento de carcinomas bucais em ratos tratados com 4-NQO. Os animais foram divididos em 7 grupos: 1- Inoculação de *C. albicans*: Dez ratos foram inoculados com suspensão de *C. albicans* por três dias consecutivos e dez animais receberam três inoculações semanais durante 180 dias; 2- Aplicação de 4-NQO por cinco meses seguida de três inoculações consecutivas de *C. albicans*: Dez ratos foram pincelados com 4-NQO no palato três vezes por semana durante cinco meses e após esse período receberam três inóculos de *C. albicans*; 3- Formação de carcinoma: Quarenta ratos normais e quinze sialoadenectomizados foram divididos nos seguintes grupos: A) Tratados com 4-NQO por cinco meses e acompanhados até a formação de carcinomas; B) Tratados com 4-NQO por cinco meses e posteriormente inoculados com *C. albicans* até a formação de carcinomas; C) Tratados com 4-NQO até a formação de carcinomas; D) Tratados com 4-NQO e *C. albicans* concomitantemente até a formação de carcinomas. Os ratos normais desenvolveram carcinomas em cerca de 320 dias, independentemente da aplicação de *C. albicans*. Nos sialoadenectomizados com ou sem *C. albicans*, o tempo médio foi de 231 dias. Estes resultados indicam que a saliva retarda a ação carcinogênica do 4-NQO. A presença de *C. albicans* não favoreceu a ação do 4-NQO, sugerindo que a amostra utilizada não tem ação co-carcinogênica.

## SUMMARY

## SUMMARY

This work studied the effects of sialoadenectomy and the application of *C. albicans* on cancer development in the oral cavity of rats. The animals were divided in seven groups: 1- Inoculation of *C. albicans*: Ten rats were inoculated with 0,2 ml of a suspension of *C. albicans* into the oral cavity during three days consecutively and ten rats received three weekly inoculation of *C. albicans* during 180 days; 2- Application of 4-NQO during 5 months followed by three inoculations of *C. albicans*: Ten rats were painted with 4-NQO on the palatal mucosae three times a week for five months. After this period, the rats received three 0,2 ml of a suspension of *C. albicans* for three days consecutively; 3- Carcinoma's formation: 15 sialoadenectomized and 40 normal rats were divided in four groups: A) Treated with 4-NQO for five months and left untreated until the formation of carcinoma; B) Treated with 4-NQO for 5 months, followed by *C. albicans* inoculation until carcinoma's formation; C) Treated with 4-NQO until carcinoma's formation and, D) treated with 4-NQO and *C. albicans* concomitantly until carcinoma's development.

Rats with intact salivary flow developed oral carcinoma in about 320 days, independently of *C. albicans* application. In sialoadenectomized rats, with or without *C. albicans*, the mean time of carcinoma development was 231 days.

These data indicate that saliva delays the carcinogenic action of 4-NQO. The presence of *C. albicans* did not favour the action of 4-NQO, suggesting that the yeast used doesn't have co-carcinogenic action.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

- ADAMS, D.; JONES, J. H. Life story of experimentally induced acute oral candidosis in the rat. J. Dent. Res., 50: 643-4, 1971.
- ADRIANO, S. M.; SCHWARZ, J. Experimental moniliasis in mice. Am. J. Pathol., 31: 859-73, 1955.
- AHEARN, G. D. Medically important yeasts. Annu. Rev. Microbiol., 32: 59-68, 1978.
- ALLEN, C. M.; BECK, F. M. Differences in mucosal reaction related to **Candida albicans** isolates. J. Oral Pathol., 16: 89-93, 1987.
- ALLEN, C. M.; BECK, F.M.; LURIE, F. A.; PINSKY, H. M. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongue. Infect. Immun., 47: 480-3, 1985.
- ALLEN, C. M.; BLOZIS, G. G.; ROSEN, S.; BRIGHT, J. S. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human median rhomboid glossitis. J. Dent. Res., 61: 1287-91, 1982.
- ALLEN, C. M.; PAULSON, R.; DUNCAN, R. Clinical, histologic and scanning electron microscopic study of the development of chronic candidiasis of the rat tongue. J. Oral Pathol. Med., 18: 352-9, 1988.

---

(\*) - Baseado em NB-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, em 1978.

Abreviaturas de periódicos de acordo com Index to Dental Literature e Index Medicus.

- ALLEN, C. M. Diagnosing and managing oral candidiasis. J. Am. Dent. Assoc., 123: 77-8, 1992.
- ALMEIDA, N. Q. Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de **Candida** sobre a patogenicidade para camundongo. São José dos Campos, Faculdade de Odontologia, Campus São José dos Campos/UNESP. 1991. (Tese Livre-Docência).
- ARENDORF, T. M.; ADDY, M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. J. Clin. Periodontol., 12: 360-8, 1985.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of **Candida albicans** in man. Arch. Oral Biol., 25: 1-10, 1980.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M.; KINGDOM, R. J.; ROLL, J. R. S.; NEWCOMBE, R. G. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leucoplakia. Br. dent. J., 155: 340-3, 1983.
- AXÉLL, J.; HOLMSTRUP, P.; KRAMER, I. R. H.; PINDBORG, J. J.; SHEAR, M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. Com. Dent. Oral Epidemiol., 12: 145-54, 1984.
- BABU, J. B.; BEACHEY, E. H.; HASTY, D. L.; SIMPSON, W. A. Isolation and characterization of a 60 kilodalton salivary glycoprotein with agglutination activity against strains of **Streptococcus mutans**. Infect. Immun., 51: 405-13, 1986.

- BAI, L.; MIHARA, K.; KONDO, Y.; HONNA, M.; NAMBA, M. Immortalization of normal fibroblasts by treatment with 4- nitrochinoline 1-oxide. Int. J. Cancer, 53: 451-6, 1993.
- BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. J. Maxillofac. Surg., 5: 69-75, 1977.
- BÁNÓCZY, J.; RIGÓ, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. Comm. Dent. Oral Epidemiol., 19: 265-7, 1991.
- BÁNÓCZY, J.; SUGAR, L. Longitudinal studies en oral leukoplakia. J. Oral Pathol., 1: 265-72, 1970.
- BARONE, R.; FICARRA, G.; GAGLIOTI, D.; ORSI, A.; MAZZOTTA, F. Prevalence of oral lesions among HIV-infected intravenous drug abusers and other risk groups. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 69: 169-73, 1990.
- BARRET-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G.; RYLEY, J. F.; A comparision of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeast. J. Gen. Microbiol., 131: 1217-21, 1985.
- BECKER, F. F. Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. Am. J. Pathol., 105: 3, 1981.
- BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral **Candida** in children. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 57: 37-40, 1984.

- BERENBLUM, I. The study of tumors in animals. In: FLOREY, L. ed. General Pathology Philadelphia: W B Saunders, 1970: 744.
- BERENBLUM, I.; SHUBIK, P. A. new qualitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouses' skin. Br. J. Cancer, 1: 383-91, 1947.
- BERTRAN, U. Xerostomia. Acta Odontol. Scand., 25: 1-126, 1967.
- BINNIE, W. H.; CAWSON, R. A.; HILL, G. B. Oral cancer in England and Wales. Studies on Medical and population subjects no. 23, London. H. M. S. O. 1972.
- BLANK, F.; CHIN, O.; JUST, G.; MERANZE, D.R.; SHIMKIN, M.B.; WIEDER, R. Carcinogens from fungi pathogenic for man. Cancer Res., 28: 2276-81, 1968.
- BLOT, W. J.; WINN, D. M.; FRAUMENI, jr., J. F. Oral cancer and mouthwash. J. Natl. Cancer Inst. 251-53, 1983.
- BLOT, W. J.; McLAUGHLIN, J. K.; WINN, D.M.; AUSTIN, D. F.; GREENDBERG, R. S.; PRESTON-MARTIN, S.; BERNSTEIN, L.; SCHOENBERG, J. B.; STEMHAGEN, A.; FRAUMENI jr., J. F. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res.; 48: 3282-87, 1988.
- BONNE, C. Uber geschwulste bei Teertieren. Zeitschrift fur Krebsforschung. 25: 1-22, 1927. Apud: EVESON, J. W. Animal models of intraoral chemical carcinogenesis: A review. J. Oral Pathol. Med., 10: 129-46, 1981.
- BOWEN, W. H.; MADISON, K.; PEARSON, S. K. Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intacts cagemates. J. Dent. Res., 67: 1316-18, 1988a.

- BOWEN, W. H.; PEARSON, S. K.; YOUNG, D. A. The effect of desalivation on coronal and root surface caries in rats. J. Dent. Res., 67: 21-3, 1988b.
- BOYD, N. M. ; READE, P. C. Factors associated with the development of neoplasia. J. Oral Pathol. Med., 17: 202-07, 1988.
- BOYLE, P.; ZHENG, T.; MacFARLANE, G. J.; MCGINN, R.; MAISONNEUEVE, P.; LA VECCHIA, C.; SCULLY, C. Recent advances in the etiology and epidemiology of head and neck cancer. Curr. Opin. Oncol., 2: 539-45, 1990.
- BRANTING, C.; SUND, M. L.; LINDER, L. E. The influence of **Streptococcus mutans** on adhesion of **Candida albicans** to acrylic surfaces "in vitro". Arch. Oral Biol., 34: 347-53, 1989.
- BRAWNER, D. L.; CUTLER, J. E. Oral **Candida albicans** isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquires immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol., 27: 1335-41, 1989.
- BROSS, I. D.; COOMBS, J. Early concepts of oral cancer among women who drink and smoke. Oncology, 33: 136-9, 1976.
- BROWN, L. R.; DREIZEN, S.; HANDLER, S.; JOHNSTON, D. A. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. J. Dent. Res., 54: 740-50, 1975.
- BRUGERE, J.; GUENEL, P.; LECLERC, A.; RODRIGUEZ, J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. Cancer, 57: 391-95, 1986.

- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Denture stomatitis IV. An experimental model in monkeys. Acta Odontol. Scand., 29: 513-26, 1971a.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Proteolytic activity of **Candida spp.** as related to the pathogenesis of denture stomatitis. Sabouraudia, 12: 266-71, 1971b.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Immune Response to **C. albicans** in monkeys with experimental candidiasis in the palate. Scand. J. Dent. Res., 81: 360-71, 1973.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. A significance of **Candida albicans** in denture stomatitis. Scand. J. Dent. Res., 82: 151-90, 1974.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Effects of triamcinolone acetonine on experimental oral candidiasis in monkeys. J. Dent. Res., 83: 171-178, 1975.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infection. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol. Scand., 48: 37-43, 1990.
- BUFORD-MASON, A. P.; WEBER, J. C. P.; WILLOUGHBY, J. M. T. Oral carriage of **Candida albicans** ABO blood group and secretor status in health subjects. J. Med. Vet. Mycol., 26: 49-56, 1988.
- BURKHARDT, A.; SEIFERT, G. Morphologische klassifikation der oralen leukoplakien. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 102: 223-9, 1977. Apud: FIELD, E. A.; FIELD, J. K.; MARTIN, M. V. Does **Candida** have a role in oral epithelial neoplasia? J. Med. Vet. Mycol., 27: 227-94, 1989.
- BURNET, F. M.; VANDERLAAN, M.; SNYDER, E.; ALBERT, R. E. Mechanism of tumor promotion and carcinogenesis. Carcinogenesis, 2: 91, 1978.

- BUTTER, K. M.; BAKER, C. J. **Candida**: an increasingly important pathogen in the nursery. Pediatr. Clin. North Am., 35: 543-63, 1988.
- CAUVIN, J. M.; GUÉNEL, P.; HILL, G. B. Occupational exposure and head and neck carcinoma. Clin. Otolaryngol., 15: 439-45, 1990.
- CAWSON, R. A. Chronic oral candidiasis and leukoplakia. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 22:582-91, 1966.
- CAWSON, R. A.; LEHNER, T. Chronic hyperplastic candidiasis: candidal leukoplakia. Br. J. Dermatol., 80: 9-16, 1968.
- CAWSON, R. A.; RAJASINGHAM, K. C. Ultrastructural features of the invasive phase of **Candida albicans**. Br. J. Dermatol., 87: 435-43, 1972.
- CHAMMAS, R.; VILLA, L. L. Aspectos celulares e moleculares da progressão tumoral. Acta Odontol. Bras., 1,2,3: 17-27, 1993.
- CHEYNE, V. D. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. J. Dent. Res., 18: 457-68, 1939.
- COHEN, B.; SMITH, C.J. Aethiological factors in oral cancer: Experimental investigation of early epithelial changes. Helv. Odont. Acta. 1: 112-24, 1967.
- COHEN, B.; POSWILLO, D.E.; WOODS, D.A. The effects of exposure to chewing tabaco on the oral mucosa of monkey and man. Ann. Royal Coll. Surg. Engl., 48: 255-73, 1971.



- CORMANE, R. H.; GOSSLING, W. R. O. Factors influencing the growth of **Candida albicans** ("in vitro" and "in vivo" studies). Sabouraudia, 3: 52-63, 1963.
- CUTLER, J. E.; FRIEDMAN, L.; MILNER, K. C. Biological and chemical characterization of toxic substances for **Candida albicans**. Infect. Immun., 6: 616-27, 1972.
- DAFTARY, D. K.; MEHTA, F. S.; GUPTA, P.C.; PINDBORG, J. J. The presence of **Candida** in 723 oral leukoplakias among indian villagers. Scand. J. Dent. Res., 80: 75-9, 1972.
- DARWAZEH, A. M. G.; LAMEY, P. J.; LEWIS, M. A. O.; SAMARANAYAKE, L. P. Systemic fluconazole therapy and "in vitro" adherence of **Candida albicans** to human buccal epithelial cells. J. Oral Pathol. Med., 20: 17-9, 1991.
- DAWES, C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance and sensation of dry mouth in man. J. Dent. Res., 66: 648-53, 1987.
- DOUGLAS, L. J.; McCOURTIE, J. Effect of tunicamycin treatment on the adherence of **Candida albicans** to human buccal epithelial cells. FEMS Microbiol. Lett., 16: 199-202, 1983.
- DOUGLAS, L. J. Adhesion of **Candida** species to epithelial surfaces. Crit. Rev. Microbiol., 15: 27-43, 1987.
- DREIZEN, S.; LEVY, B. M. Handbook of experimental stomatology. Boca raton, Florida, CRC Press. 1981. pag. 135-88.
- EDGARD, W. M. Saliva and dental health. Br. Dent. J., 11: 96-8, 1990.

EDGARD, W. M. Saliva: its secretion, composition, and function. Br. Dent. J. 172: 305-12, 1992.

EPSTEIN, J. B.; DECOTEAU, W. E.; WILKINSON, A. Effect of sialor in treatment of xerostomia in Sjögren's syndrome. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 56: 495-99, 1983.

EPSTEIN, J. B.; KIMURA, L. H.; MENARDI, T. W.; TRUELOVE, E. L.; PEARSALL, N. N. Effects of especific antibodies in the interaction between the fungus **Candida albicans** and human oral mucosa. Arch. Oral Biol., 27: 469-74, 1982.

EPSTEIN, J. B.; PEARSAL, N. N.; TRUELOVE, E.L. Quantitative relationship between **Candida albicans** in saliva and the clinical status of human subjects. J. Clin. Microbiol., 12: 475- 6, 1980.

EPSTEIN, J. B.; STENVENSON-MOORE, P.; SCULLY, C. Management of xerostomia. J. Can. Dent. Assoc., 58: 140-3, 1992.

EVESON, J. W.; MACDONALD, D.G. Effects of the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide on hamsters lingual mucosa. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 44: 600-5, 1980.

FIELD, R. B.; DROMY, R.; HAND, A. R. Regulation of secretion of enzymes from Von Ebner's gland of rat tongue. J. Dent. Res., 66: 586-87, 1987.

FIELD, E. A.; FIELD, J. K.; MARTIN, M. V. Does **Candida** have a role in oral epithelial neoplasia? J. Med. Vet. Mycol., 27: 277-94, 1989.

- FISKER, A. V. Experimental oral carcinogenesis: a basic model for the study of oral carcinogenesis using the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Danish. Med. Bull., 37: 433-43, 1990.
- FISKER, A. V.; PHILIPSEN, H. P.; OVERVAD, K. Dose-response relationship in complete oral 4-NQO carcinogenesis in rats. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 95: 281-8, 1987.
- FISKER, A. V.; RINDOM-SCHIOTT, C.; PHILIPSEN, H. P. Long-term oral candidosis in rats. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 90: 221-7, 1982.
- FISKER, A. V.; WEST, M. I.; PHILIPSEN, H. P.; ANDERSEN, A. H. Quantification of oral epithelial hyperplasia in rats after topical application of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Acta Odontol. Scand., 48: 125-31, 1990.
- FOX, C. P.; VAN DER VEN, P. F.; SONIES, B. C. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. J. Am. Dent. Assoc., 110: 519-25, 1985.
- FRANCO, E. L.; KOWALSKI, L. P.; OLIVEIRA, B. V.; CURADO, M. P.; PEREIRA, R. N.; SILVA, M. E.; FAVA, A. S.; TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. Int. J. Cancer. 43: 992-1000, 1989.
- FRANKER, C. K.; LUCATORTO, F. M.; JOHNSON, B. S.; JACOBSON, J. J. Characterization of the microflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. Oral surg. Oral Med. Oral Pathol., 69: 683-87, 1990.
- FREITAS, H. R.; BIRMAN, E. G. Candidose bucal: aspectos clínicos e terapêuticos. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent., 43: 227-30, 1989.

- FUENTES, C. A.; SCHWARTZ, J.; ABOULAFIA, R. Some aspects of the pathogenicity of **Candida albicans** in laboratory animals. Mycopathol. Mycol. Appl., **6**: 176-81, 1952.
- FUJINO, H.; CHINO, T.; IMAI, T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. J. Nat. Cancer Inst., **37**: 907-918, 1965.
- FUJITA, K.; KAKU, T.; SASAKI, M.; ONOE, T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1,2 benzanthracene. J. Dent. Res., **52**: 327-33, 1973.
- GARRET, J. R. The proper role of nerves in salivary secretion. J. Dent. Res., **66**: 387-97, 1987.
- GERGELY, L.; URI, J. Day-by-day variation in the mycotic flora of the mouth. Arch. Oral Biol., **2**: 15-9, 1966.
- GIBBONS, R. J.; van HOUTE, J. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinants. Infect. Immun., **3**: 567-73, 1971.
- GIBBONS, R. J. van HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu. Rev. Microbiol., **29**: 19-44, 1975.
- GINSBURG, I.; FLIGIEL, S. E. G.; KUNKEL, R. G.; RISEL, B. L.; VARINI, J. Phagocytosis of **Candida albicans** enhances malignant behaviour of murine tumor cells. Science, **238**: 1573-75, 1987.

- GLASS, B. J.; VAN DIS, M. L.; LANGLAIS, R. P.; MILES, D. A. Xerostomia: diagnosis and treatment planning considerations. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 58: 248-52, 1984.
- GRAD, H.; GRUSHKA, M.; YANOVER, L. Drug induced xerostomia. The effects and treatment. J. Can. Dent. Assoc., 4: 296-300, 1985.
- GRAHAM, S.; DAYAL, H.; ROHER, T.; SWANSON, M.; SULTZ, H.; SHEDD, E.; FICHMAN, S.; Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. J. Natl. Cancer Inst., 59: 1611- 18, 1977.
- GUANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H.; STRETTON, R. J.; WHITTAKER, P. A. Effects of octenidine and pitermidine on adhesion of **Candida** species to human buccal epithelial cells "in vitro". Arch. Oral Biol., 35: 249-53, 1990.
- GUANNOUM, M. A. Mechanisms potentiating **Candida** infections. A review. Mycosen, 31: 543-7, 1988.
- HAMADA, G. S.; BOS, A. J.; KASUGA, H.; HIRAYAMA, T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. Tokay J. Exp. Clin. Med., 16: 63-72, 1991.
- HAMOSH, M.; BURNS, W. A. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). Lab. Invest., 37: 603-08, 1977.
- HASENCLEVER, H. F.; MITCHEL, W. O. Antigenic studies of **Candida** III. Comparative pathogenicity of **Candida albicans** group A, group B and **C. stellatoidea**. J. Bacteriol., 82: 578-81, 1962.

- HASENCLEVER, H. F.; MITCHEL, W. O. Pathogenicity of *Candida albicans* and *C. torulopsis*. Sabouraudia, 1: 16-21, 1961.
- HASSAN, M. M. A.; SHKLAR, G.; SOLT, D.; SZABO, G. Acute effect of DMBA application on mitotic activity of hamster buccal pouch epithelium. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 59: 491-8, 1985.
- HERNANDEZ, Y. L.; DANIELS, T. E. Oral candidiasis in Sjögrens syndrome: prevalence, clinical correlations and treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 68: 324-9, 1989.
- HERRERA, J. L.; LYONS, M. F.; JOHNSON, L.F. Saliva: Its role in health and disease. J. Clin. Gastroenterol., 10: 569-78, 1988.
- HEYMDAHL, A.; NORD, C. E. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. Acta Odontol. Scand., 48: 77-84, 1990.
- HOGEWIND, W. F. C.; van der WALL, I.; van der KWAST, W. A. M.; SNOW, G. B. The association of white lesions with oral squamous cell carcinoma. A retrospective study of 212 patients. Int. Oral Maxillofac. Surg., 18: 163-64, 1989.
- HOLMSTRUP, P.; AXÉLL, T. Classification and clinical manifestation of oral yeast infections. Acta Odontol. Scand., 48: 57-9, 1990.
- HOLMSTRUP, P.; DABELSTEEN, E. The frequency of *Candida* in oral lichen planus. Scand. J. Dent. Res., 82: 584-87, 1974.

- HSIA, C. C.; SUN, T. T.; WANG, Y. Y.; ANDERSON, L. M.; ARMSTRONG, D.; GOOD, R. A. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylmethylnitrosamine from its precursors by *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 1878-81, 1981.
- HYRAYAMA, T. An epidemiological study of oral and pharyngeal cancer central and south-east Asia. Bull. WHO, 34: 41-69, 1966.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - Registro nacional de patologia tumoral: diagnóstico de câncer. Brasil 1981-1985. Rio de Janeiro, 1991. p. 212.
- ITO, V. S. Efeitos da xerostomia nas estruturas bucais de rato. Tese-Mestrado, Piracicaba, São Paulo, UNICAMP. 1990.
- IWATA, K. Fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infection. In: Recent Advances in Medical and Veterinary Micology. Tokio. Ed. k. Iwata, 1975 p. 15-33.
- JANSMA, J.; VISSINK, A.; 's-GRAVENMADE, E. J.; DE JOSSELIN DE JONG, E.; JONGEBLOED, W. L.; RETIEF, D. H. A model to investigate xerostomia related dental caries. Caries Res., 22: 357-61, 1988.
- JOHANSSON, S. L.; HIRSCH, J.M.; LARSON, P. A.; SAIDI, J.; ÖSTERDHAHL, B.G. Snuff-induced carcinogenesis: Effect of snuff in rats initiated with 4-nitroquinoline N-oxide. Cancer Res., 49: 3060-69, 1989.
- JOHANSSON, S. L.; SAIDI, J.; ÖSTERDHAL, B. G.; SMITH, R. A. Promoting effect of snuff in rats initiated by 4-nitroquinoline N-oxide or 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. Cancer Res., 51: 4388-4394, 1991.

- JONES, J. H.; ADAMS, D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. Br. J. Dermatol., 83: 670-73, 1970.
- JONES, J. H.; RUSSEL, C. Experimental oral candidiasis in weanling rats. J. Dent. Res., 52: 182, 1973.
- JONES, J. H.; RUSSEL, C.; YOUNG, C.; OWEN, D. Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of germ-free and conventionalized rats with **Candida albicans**. Chemother., 2: 247-53, 1976.
- JONES, J. H.; RUSSEL, C. The histology of chronic candidal infection of rat's tongue. J. Pathol., 113: 97-100, 1974.
- JORGE, A. O. C. Efeitos da sialoadenectomia na presença de **Candida albicans** e candidose na cavidade bucal de ratos. Tese-Doutorado, Piracicaba, São Paulo, UNICAMP. 1991
- JORGE, A. O. C.; TOTTI, M. A. G.; ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of **Candida albicans** in the mouths of rats. J. Oral Pathol. Med., 22: 138-40, 1993a.
- JORGE, A. O. C.; TOTTI, M. A. G.; ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomized rat. J. Oral Pathol. Med., 22: 54-6, 1993b.
- KELLER, A. Z. Survivorship with mouth and pharynx cancers and their association with cirrhosis of the liver, marital status, and residence. A. J. P. M., 59: 1139, 53, 1969.
- KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. M. Adherence of **Candida albicans** to human buccal epithelial cells. Infect. Immun., 21: 64-8, 1978.



- KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. M. Relationship between germination of **Candida albicans** and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect. Immun., 28: 464-68, 1980.
- KITANO, M.; HATANO, H.; SHISA, H. Strain difference in susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinoma in rat. Jpn. J. Cancer Res., 83: 843-50, 1992.
- KLAPPER, C. E.; VOLKER, J. F. The influence of impaired salivary function on dental caries in the syrian hamster. J. Dent. Res., 32: 219-23, 1953.
- KOCK, H. Cancer and enviroment. Int. Dent. J., 27: 154-64, 1977.
- KOMSHIAM, S. V.; UWAYDAH, A. K.; SOBEL, J. D.; CRANE, L. R. Fungemia caused by **Candida** species and **Torulopsis glabrata** in hospitalized patient: frequency, characterization and evaluation of factors influencing outcome. Rev. Infect. Dis., 11: 379-90, 1989.
- KOOP, H. M.; VALENTIJN, M.; NIEUW, A. V.; ROUKEMA, P. A.; de GRAAFF, J. Influence of human whole saliva on bacterial aggregation. J. Dent. Res., 66: 613-15, 1987.
- KREGER VAN RIJ, N. J. W. The yeasts: a taxonomic study., 3 ed., Amsterdam, Elsevier Science Publisers, 1984. p. 585-844.
- KRESHOVER, S. J.; SALLEY, J. J. The effect of tabacco on epithelial tissues of mice. J. A. D. A., 45- 528-40, 1957.

- KROGH, P.; HOLMSTRUP, P.; THORN, J. J.; VEDTOFTE, P.; PINDBORG, J. J. Yeasts species and biotypes associated with oral leucoplakia and lichen planus. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 63: 48-54, 1987.
- KROGH, P. The role of yeasts in oral cancer by means of endogenous nitrosation. Acta Odontol. Scand., 48: 85-8, 1990.
- KUTUZOV, H.; SICHER, H. The filiform and conical papillae of the tongue in the white rat. Anat. Rec., 110: 275-88, 1951.
- KUTUZOV, H.; SICHER, H. Anatomy and function of the palate in the white rat. Anat. Rec., 114: 67-84, 1952.
- LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; D'AVANZO, B.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Dietary indicators of oral and pharyngeal cancer. Int. J. Epidemiol., 20: 39-44, 1991.
- LACASSE, M.; FORTIER, C.; TRUDEL, L.; COLLET, A. J.; DESLAURIERS, N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. J. Oral Pathol. Med., 19: 136-41, 1990.
- LACAZ, C. S. Candidiasis. São Paulo, Ed. Pedagógica Universitária e Ed. Universidade de São Paulo, 1980, 190p.
- LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILIP, J. Mc. Toxicity associated with certain samples of ground nuts. Nature, 12: 1095-61, 1961.
- LAY, K. M.; RUSSEL, C. **Candida** species and yeasts in mouth of infants from special care of a maternity hospital. Arch. Dis. Clin., 52: 794-04, 1977.

- LEKHOLM, U.; WALLENIS, K. Experimental oral cancer in rats with xerostomia. Odont. Revy., 27: 11-8, 1976.
- LILIENTHAL, B. Studies of the flora of the mouth. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 28: 279-86, 1950.
- LODDER, J. The yeast: A taxonomic study. Amsterdam North-Holland. Publishing Company, 1971. p. 914-920, 968-970, 982-985, 1022-1024, 1059-1063.
- MacCOURTIE, J.; DOUGLAS, L. J. Relationship between cell surface composition of **Candida albicans** and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect. Immun., 32: 1234-44, 1981.
- MacKINNON, J. E. (1936). Apud: JONES, J. H.; ADAMS, D. Experimentally acute candidosis in the rat. Br. J. Dermatol., 83: 670-73, 1970.
- MAEDA, H.; KAMEYAMA, Y. Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. J. Oral Pathol., 15: 21-27, 1986.
- MAIBACH, H. I.; KLIGMAN, A. M. The biology of experimental human cutaneous moniliasis (**Candida albicans**). Arch. Dermatol., 85: 233-57, 1962.
- MAIER, H.; DIETZ, A.; GEWELKE, U.; HELLER, W. D.; WEIDAUER, H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. Clin. Investig., 70: 320-27, 1992.
- MANDEL, I. D. The function of saliva. J. Dent. Res., 66: 623-7, 1987.
- MANDEL, I. D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J. Am. Dent. Assoc., 119: 298-304, 1989.

- MANDEL, I. D. The diagnostic uses of saliva. J. Oral Pathol. Med., 19: 119-25, 1990.
- MANKOWSK, Z. T. Occurrence of malignancy, collagen diseases and myasthenia gravis in the course of experimental infection with **C. albicans**. Mycopath. Mycol., 19: 1-20, 1963.
- MANKOWSKI, Z. T. Influence of **Candida albicans** glycoprotein on 3-methylcholanthrene-induced malignancy in newborn rodents. Mycopathol. Mycol. Appl., 44: 95-100, 1971.
- MARDT, P. A.; WESTRON, L. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells. Infect. Immun., 13: 661-66, 1976.
- MAREFAT, M. P.; ALBRIGHT, J. T.; SHKLAR, G. Ultrastructural alterations in experimental lingual leukoplasia and carcinoma. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 47: 334-42, 1979.
- MARINA, N. M.; FLYNN, P.M.; RIVERA, G. K.; HUGHES, W. T. **Candida tropicalis** and **Candida albicans** fungemia in children with leukemia. Cancer, 68: 594-9, 1991.
- MARRIE, T. J.; COSTERTON, J.W.; The ultrastructure of **Candida albicans** infections. Can. J. Microbiol., 27: 1156-64, 1981.
- MARTÍNEZ, I. Factors associated with cancer of the esophagus, mouth, and pharynx in Puerto Rico. J. Nat. Cancer Inst., 42: 1069-94, 1969.
- MASHBERG, A.; GARFINKEL, L.; HARRIS, S. Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. C. A. 31: 146, 1981.

- MATTHEWS, J. B.; MASON, G. I.; SCULLY, C. M.; PRIME, S. S. "In situ" characterization of oral mucosal inflammatory cell response of rats induced by 4-nitroquinoline N-oxide. Carcinogenesis, 7: 783-8, 1986.
- Mc. CARTHY, G. M. Host factors associated with HIV-related oral candidiasis. A review. Oral surg. Oral Med. Oral Pathol., 73: 181-6, 1992.
- McLAUGHLIN, J. D.; GRIDLEY, G.; BLOCK, G.; WINN, D. D.; PRESTON-MARTIN, S.; SHOENBERG, J. B.; BLOT, W. J.; FRAUMENI, jr., J. F. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. J. Natl. Cancer Inst., 80: 1237-43, 1988.
- McNABB, P. C.; TOMASI, T. B. Host defence mechanisms at mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol., 35: 477-96, 1981.
- MEITNER, S. W.; BOWEN, W. H.; HAIDARIS, C. G. Oral and esophageal **Candida albicans** infection in hiposalivatory rats. Infect. Immun., 58: 2228-36, 1990.
- MERLETI, F.; BOFETTA, P.; CICCONE, G.; MASHBERG, A.; TERRACINI, B. Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity oropharynx in Torino, Italy. Cancer Res., 49: 4919-24, 1989.
- MOORE, C. Multiple mouth-throat cancer. Am. J. Surg., 110: 534-6, 1965.
- MOSS, E.; LEE, W. R. Occurrence of oral and pharyngeal cancers in the textile workers. Br. J. Ind. Med., 31: 224-32, 1974.
- MOURAD, S.; FRIEDMAN, L. Pathogenicity of **Candida**. J. Bacteriol., 81: 550-1, 1961.

- MULLER, H. K.; HALLIDAY, G. M.; KNIGHT, B. A. Carcinogen-induced depletion of cutaneous Langerhans cells. Br. J. Cancer, 52: 81-5, 1985.
- NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Adv. Cancer Res., 23: 131-67, 1986.
- NAKAHARA, W.; FUKUOKA, F.; SUGIMURA, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide Gann., 48: 129-137, 1957.
- NAVARRO, C. M. Efeitos da sialoadenectomia na carcinogenese bucal de ratos provocada pelo óxido de nitroquinolina (4-NQO). Faculdade de Odontologia de Piracicaba/ UNICAMP, 1992. (Tese Mestrado).
- NAVARRO, C.M.; ALMEIDA, O. P.; SCULLY, C. Oral focal acantholytic dyskeratosis induced in sialoadenectomized rats painted orally with the carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. Bull. Tokyo Dent. Coll., 34: 191-94, 1993.
- OCHIAI, E.; SEI, S. J. Pharmac. Soc. Japan., 65: 18, 1945. Apud: NAKAHARA, W.; FUKUOKA, F.; SUGIMURA, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. Gann., 48: 129-37, 1957.
- ODDS, F.C. Candida and candidosis. Baltimore, Leicester, Univ. Press, 1979. p. 352.
- ODDS, F. C. **Candida** infection: an overview. Critical Rev. Microbiol., 15: 1-5, 1987.
- ODDS, F. C.; KIBBLER, C. C.; WALKER, E.; BHAMRA, A.; PRENTICE, H. G.; NOONE, P. Carriage of **Candida** species **Candida albicans** biotypes in patients undergoing chemotherapy on bone marrow transplantation for haematological disease. J. Clin. Pathol., 42: 1259-66, 1982.

- ODUKOYA, O.; SKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 58: 315-320, 1984.
- OHNE, M.; SATHOH, T.; YAMADA, S.; TAKAI, H. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in drinking water. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 59: 600-7, 1985.
- OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol. Scand., 48: 71-4, 1990.
- OLSEN, I.; STENDERUP, A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. Acta. Odontol. Scand., 48: 11-18, 1990.
- OLSEN, I.; HAANES, H. R. Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. Scand. J. Dent. Res., 85: 135-141, 1977.
- OSTERBERG, T.; LANDHAL, S.; HEDEGARD, M. Salivary flow, saliva, pH and buffering capacity in 70-year-old men and women. J. Oral Rehabil., 11: 157-70, 1984.
- OTSUBO, Y. e KAMEYAMA, Y. Ultrastructural changes of epithelium-conective tissue junction in experimental lingual tumors. J. Oral Pathol. Med., 11: 159-73, 1982.
- OYAMA, S. Experimentelle Studien uber die Entstechung des Zungenkrebses. Mitteilungen aus der Medizinischen Akademie zu kioto, 15: 861-80, 1935. Apud: EVESON, J. W. animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. J. Oral Pathol. Med., 10: 126-46, 1981.

- PALMER, D. E. Alcohol consumption and cellular immunocompetence. Laryngoscope, 88: 13-7, 1978.
- PENATTI, A. H. Anatomia patológica da candidíases. Apud: LACAZ, C. S. Candidíasis. São Paulo Ed. Pedagógica Universitária e Ed. Universidade de São Paulo, 1980 p. 101-12.
- PEREIRA, H. A.; HOSKING, C. S. The role of complement and antibody in opsonization and intracellular killing of **Candida albicans**. Clin. Exp. Immunol., 57: 307-413, 1984.
- PERRIM, C.; ASTRE, C.; BROQUERIE, E.; SAINT AUBERT, B.; JOYEUX, H. Lingual fibrosarcoma induced by 7,12-dimethylbenzanthracene in the rat. J. Oral Pathol. Med., 19: 13-15, 1990.
- PHILIPSEN, H.; FISHER, A. V. Focal acantholytic dyskeratosis in experimental oral carcinogenesis in rats. J. Oral Pathol., 12: 30-36, 1983.
- PHILLIPS, A. W.; BALISH, E. Growth and invasiveness of **Candida albicans** in germ-free and conventional mouse after oral challenge. Appl. Microbiol., 14: 737-41, 1966.
- PINDBORG, J. J. Oral cancer and precancer. Bristol, John-Wright & Sons Ltda. 1980.
- PITIGALA-ARACHCHI, A.; MATTHEWS, J. B.; CRANE, I. J.; SCULLY, C.; PRIME, S. S. Ia<sup>+</sup> epithelial dendritic cells during oral carcinogenesis in rat. J. Oral Pathol. Med., 17: 138-44, 1988.



- POLLOCK, J. J.; DENEPITIYA, L.; MacKAY, B.; IACONO, V. J. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polipeptidy on **Candida albicans**. Infect. Immun., 44: 702-7, 1984.
- POLLOCK, J. J.; LOTARDO, S.; GAVAI, R.; GROSSBARD, B. L. Lysozyme-protease-inorganic monovalent anion lysis of oral bacterial strains in buffer and stimulated whole saliva. J. Dent. Res., 66: 467-74, 1987.
- PORTUGAL, C.; MARTINS, A. B. A. Etiologia traumática na neoplasia. Oral Rev. Port. Estomat. Cirurg. Maxilofac., 23: 43-62, 1982.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in **Candida albicans**. Sabouraudia, 20: 7-14, 1982.
- PRIME, S. S.; MacDONALD, D.G.; SAWYER, D. R.; RENNIE, J.S. The effect of iron deficiency on early oral carcinogenesis in rat. J. Oral Pathol., 15: 265-67, 1986.
- PRIME, S. S.; MALAMOS, D.; ROSSER, T.; SCULLY, C. Oral epithelial atipia and acantholytic diskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. J. Oral Pathol., 15: 280-83, 1986.
- RAMIREZ, V.; GONZÁLEZ, A.; de la ROSA, F.; GONZÁLEZ, M.; RIVERA, I.; HERNANDEZ, C.; POCE DE LEON, S. Oral lesions in Mexican HIV-infected patients. J. Oral Pathol. Med., 19: 482-5, 1990.
- RAY, T. L.; PAYNE, C. D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: A role for **Candida** acid proteinase. Infect. Immun., 56: 1942-49, 1988.

- REED, M. F.; SCRAGG, M. A.; WILLIAMS, D. M.; SOAMES, J. V. "In vivo" effects of **Candida albicans** products on rat oral epithelium. J. Oral Pathol. Med., 19: 326-29, 1990.
- RENHOLDT, J.; KROG, P.; HOLMSTRUP, P. Degradation of IgA1, IgA2 and s-IgA by **Candida** and **Torulopsis** species. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 95: 265-74, 1987.
- RENNIE, J. S.; HUTCHEON, A. W.; MacFARLANE, T. W.; MacDONALD, D. G. The role of iron deficiency in experimentally-induced oral candidosis in the rat. J. Med. Microbiol., 16: 363-69, 1984.
- RENSTRUP, G. Occurrence of **Candida** in oral leukoplakias. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 78: 421-24, 1970.
- RICH, A. M.; READE, P.C. Histomorphometric analysis of epithelial changes in chemically induced oral mucosal carcinogenesis in rats. J. Oral Pathol., 17: 528-33, 1988.
- ROED-PETERSEN, B.; RENSTRUP, G.; PINDBORG, J. J. **Candida** in oral leukoplakia., J. Dent. Res., 78: 323-28, 1971.
- ROFFO, A. H. Leucoplasie experimentale produite par la tabac. SudAméricaine de Médecine et de Chiirurgie, 1: 321-30, 1930. Apud: EVESON, J. W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: A review. J. Oral Pathol. Med., 10: 129-46, 1981.
- ROGERS, T.; BALISH, E. Experimental **Candida albicans** infection in conventional rats. Infect. Immun., 14: 33-38, 1980.

- ROTROSEN, D.; CALDERONE, R. A.; EDWARDS, J. E. Jr. Adherence of **Candida** species to host tissues and plastic surfaces. Rev. Infect. Dis., 8: 73-85, 1986.
- RUCHEL, R. A variety of **Candida** proteinases and their possible targets of proteolysis attack in the host. Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene, 257: 266-74, 1984.
- RUCHEL, R. Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeast of the genus **Candida**. Microbiol. Sci., 3: 316-9, 1986.
- RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of **Candida albicans**. Sabouraudia, 20: 233-44, 1982.
- RUSSEL, C.; LAY, K. M. Natural flora of **Candida** species and yeasts in the oral cavities of infants. Arch. Oral Biol., 18: 957-62, 1973.
- SAKAI, S.; MINODA, K.; AKAGI, S.; VENO, A. SAITO, G.; SATO, A. Studies on chemotherapy of **Trichophyton** infections: (XI) therapeutic efficiency of quinoline derivatives. J. Sci. Res. Inst., 51: 18-21, 1957.
- SALLEY, J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. J. Dent. Res., 33: 253-262, 1954.
- SALVIN, S. B. Endotoxin in pathogenic fungi. J. Immunol., 69: 89-99, 1952.
- SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. An "in vitro" study of the adherence of **Candida albicans** to acrylic surfaces. Arch. Oral Biol., 25: 603-9, 1980.

- SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. The adhesion of the yeast **Candida albicans** to epithelial cells of human origin "in vitro". Arch. Oral Biol., 26: 815-20, 1981.
- SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. Factors affecting the "in vivo" adherence of fungal oral pathogen **Candida albicans** to the epithelial cells of human origin. Arch. Oral Biol., 27: 867-73, 1982.
- SAMARANAYAKE, L. P.; McLAUGHLIN, L.; MacFARLANE, T. W. Adherence of **Candida** species to fibrin clots "in vitro". Mycopathologia, 102: 135-8, 1988.
- SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MacFARLANE, T. W. Factors affecting the phospholipase activity of **Candida** species "in vitro". Sabouraudia, 22: 201-07, 1984.
- SAMARANAYAKE, L. P.; McCOURTIE, J.; MacFARLANE, T. W. Factors affecting the "in vitro" adherence of **Candida albicans** to acrylic surfaces. Arch. Oral Biol., 25: 611-15, 1980.
- SANDIN, R. L.; ROGERS, A. L.; FERNANDEZ, M. I.; BENEKE, E. S. Variation in affinity to **Candida albicans** "in vitro" among human buccal epithelial cells. J. Med. Microbiol., 24: 151-5, 1987.
- SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. Acta Odontol. Scand., 48: 27-36, 1990.
- SANKARANARAYANAN, R.; DUFFY, S. W.; DAY, N. E.; NAIR, M. K.; PADMANKUMARY, G. A case-control investigation of cancer of the oral tongue and floor of the mouth in southern India. Int. J. Cancer., 44: 617-21, 1989.

- SCULLY, C. Oncogenes, onco-supressors, carcinogenesis and oral cancer. Br. Dent. J., 173: 55-9, 1992.
- SCULLY, C. Xerostomia. Lancet, 1: 884, 1989.
- SEAGAL, E.; LEHRMAN, O.; DAYAN, D. Adherence "in vitro" of various **Candida** species to acrylic surfaces. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 66: 670-73, 1988.
- SHAFER, W. G.; HINE, M. H.; BARNET, M. L. Tratado de patologia bucal. 2ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985. p. 363-67.
- SHATZMAN, A. R.; HENKIN, R. J. Gustin concentrations changes relative to salivary zinc and taste in humans. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 3867-71, 1981.
- SHAW, J. H.; WOLLMAN, D. H. The influence of sialoadenectomy in rats on food and water consumption. J. Dent. Res., 37: 805-10, 1958.
- SHEPERD, M. G.; POULTER, R. T. M.; SULLIVAN, P. A. **Candida albicans**: biology, genetics and pathogenicity. Annu. Rev. Microbiol., 39: 579-614, 1985.
- SHIMIZU, M. T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero **Candida**. Rev. Microbiol., 19: 442-5, 1988.
- SHIMIZU, M. T. Produção de hialuronidase, condroitin-sulfatase, proteinase e fosfolipase por amostras de Candida albicans e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente. São José dos Campos, Faculdade de Odontologia, campus São José dos Campos/UNESP, 1990 105p. (Tese Livre-Docência).

- SILVERMAN, S.; ROZEN, R. D. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. J. A. D. A., 76: 772-77, 1968.
- SILVERMAN, S.; GORSKI, M.; LOZADA, T. Oral leukoplakia and malignant transformation. Cancer, 53: 563-68, 1984.
- SINGER, B.; GRUNDBERGER, D. Molecular biology of mutagens and carcinogens. New York. Plenum Press. 1983. pp. 171.
- SOBEL, J. D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H. R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. Infect. Immun., 44: 578-8, 1984.
- SPIECHOWICZ, E.; SANTARPIA, III, R. P.; POLLOCK, J. J.; RENNER, R. P. "In vitro" study on the inhibiting effect of different agents on the growth of **Candida albicans** on acrylic resin surfaces. Quintessence Int., 21: 35-40, 1990.
- SPITIZER, W. O.; HILL, G. B.; CHAMBERS, L. W.; HELIWELL, B. E.; MURPHY, H. B. The occupation of fishing as a risk factor in cancer of the lip. N. Engl. J. Med., 293: 419-24, 1975.
- STENDERUP, A. Oral mycology. Acta Odontol. Scand., 48: 3-10, 1990.
- STICH, H. F.; MATTHEWS, B.; SANKARANARAYANAN, R.; NAIR, M. K. Remission of precancerous lesions in the oral cavity of tobacco chewers and maintenance of the protective effect of  $\beta$ -carotene or vitamin A. Am. J. Clin. Nutr., 53: 298-7, 1991.
- STITE, S.D.P.; STOBO, J. D.; WELL, J. V. Basic & Clinical Immunology. 6ed. 1987. pp. 186-87.

- STLEIDER, N. E.; READE, P. C. Initiation and promotion of experimental oral carcinogenesis in mice. J. Oral Pathol. Med., 15: 43-7, 1986.
- STLEIDER, N.E.; READE, P.C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline 1-oxide. Oral Surg. Oral Med. Oral Pthol., 57: 524-531, 1984.
- STORMBY, N. G.; WALLENIS, K. Effect of reduced salivation on oral tumor induction in hamster by 9, 10-dimethyl 1-2-benzanthracene. Odont. Revy., 15: 186, 1964.
- SUDDICK, R. P.; DOWD, F. J. Mechanism of secretion of saliva. In: The biological basis of dental caries. L. Menaker, Ed. hagerstow: Harper and Row, pp. 64-112, 1980.
- SVENSON, S.; HEYDEN, G. Experimental induction of irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. Int. J. Oral Surg., 11: 52-58, 1982.
- TABACK, L. A.; LEVINE, M. J.; MANDEL, I. D.; ELLISON, S. A. Role of salivary mucins in the protection of oral cavity. J. Oral Pathol., 11: 1-17, 1982.
- TAPPER-JONES, L.; ALDRED, M.; WALKER, D. M. Prevalence and intraoral distribution of **Candida albicans** in Sjögren's syndrome. J. Clin. Pathol., 68: 294-5, 1977.
- TENEVUO, J.; PRUITT, K.; THOMAS, E.L. Peroxidase antimicrobial system of human saliva: hypothiocyanite levels in resting and stimulated saliva. J. Dent. Res., 61: 982-85, 1982.

- TETU, E.; GREIN, N. J.; CAMPELLI, R. B. Profilaxia do câncer bucal: Proteção específica. Ars. Cur. Odont., 3: 35-45, 1977.
- THOMAS, J. E.; FAECHER, R. S. A physician's guide to early detection of oral cancer. Geriatrics, 47: 58-63, 1992.
- THOMASI, A. F. Diagnóstico em Patologia Bucal. São Paulo. Artes Médicas. 1989.
- TOTTI, M. A. G. Recuperação de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* da cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados. Faculdade de Odontologia de Piracicaba/ UNICAMP, 1994. (Tese Mestrado).
- TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J. P.; ROBERT, R.; SENET, J.M. Adherence of ***Candida albicans*** germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. Infect. Immun., 56: 1987-93, 1988.
- TWEETMAN, S.; LINDQUIST, L.; SUND, M. L. Effect of human lysozyme on 2-deoxyglucose uptake by ***Streptococcus mutans*** and other oral microorganisms. Carie Res., 20: 223-9, 1986.
- TWEETMAN, S.; LINDQUIST, L. Effect of salivary lysozyme on glucose incorporation and acid production of ***Streptococcus mutans***. Caries Res., 19: 414-21, 1985.
- VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in the mouth. Rev. Infect. Dis., 5: 659-69, 1983.
- VOGLER, W.R.; LLOYD, W.; MILMORE, B. K. A retrospective study of etiological factors in cancer of the mouth, pharynx and larynx. Cancer, 15: 246-58, 1962.



- VUDHICHAMNONG, K.; WALKER, D. M.; RYLEY, H. C. The effects of secretory Immunoglobulin A on the "in vitro " adherence of the yeast **Candida albicans** to human oral epithelial cell. Arch. Oral Biol., 27: 617-21, 1982.
- WALLACE, M.; PETRUSNECK, F. The dental implications of xerostomia. A review of the literature. J. Ala. Dent. Assoc., 69: 44-7, 1985.
- WALLENIOUS, K. Effect of 7-12 dimethylbenz(a)anthracene on rat's skin transplanted to the buccal cavity. Odont. Revy., 16: 283, 1965.
- WALLENIOUS, K. Experimental oral cancer in the rat with special reference to the influence of saliva. Acta Odontol. Scand., 1966: suppl. 180.
- WALLENIOUS, K.; AHLSTROM, U.; HEYDEN, G. Citogenetic and histochemical analyses of experimental oral carcinogenesis in the rat. Odont. Revy., 26: 309-26, 1975.
- WALLENIOUS, K.; LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water or fat soluble carcinogens. Odont. Revy., 24: 115-126, 1973.
- WALLENIOUS, K.; MATHUR, A.; ABDULLA, M. Effect of different levels of dietary zinc on development of chemically induced oral cancer in rats. Int. J. Oral. Surg., 8: 56-62, 1979.
- WEAVER, A.; FLEMING, S. M.; SMITH, D.B. Mouthwash and oral cancer: Carcinogen or coincidence? J. Oral Surg., 37: 250-3, 1979.

- WHITE, F. M.; GOHARI, K.; SMITH, C. J. Histological and ultrastructural morphology of 7,12 dimethylbenzanthracene carcinogenesis in hamster cheek pouch epithelium. Diagnostic. Histopathol., 4: 307-33, 1981.
- WILKIESON, C.; SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W.; LAMEY, P. J.; MacKENIE, D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. J. Oral Pathol. Med., 20: 13-16, 1991.
- WILLIANSOON, J. J. Diurnal variation of **Candida albicans** counts in saliva. Aust. Dent. J., 17: 106-09, 1972.
- WINDER, E.; IRWIN, J. B.; FELDMAN, M. A study of the etiological factors in cancer of mouth. Cancer, 10: 1300-23, 1957.
- WINN, D.M.; ZIEGLER, R. G.; PICKLE, L. W.; BLOT, W. J.; HOOVER, R. N. Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among woman from southern United States. Cancer Res., 44: 1216-22, 1984.
- WINNER, H. I. Experimental appoax to the study of infections by yeast-like organisms. Proc. R. Soc. Med., 51: 496-99, 1958.
- WONG, P. N. C.; WILSON, D. F. 4- nitroquinoline 1- oxide induced carcinogenesis in rat palate. J. Oral Pathol. Med. , 12: 375-84, 1983.
- WRAY, D.; FELIX, D. H.; CUMMING, C. G. Alteration of humoral responses to **Candida** in HIV infection. Br. Dent. J., 21: 326-29, 1990.

YAMAMURA, T.; NISHIDA, Y.; EDAS, S.; SHIMONG, M.; YAMANE, H.;  
TACHIKAWA, T.; KOIC, H.; ICHIKAWA, T.; YOSHIDA, M.; WATANABE, O.;  
MATSCYAMA, H. An experimental study of intraoral carcinogenesis in rats. Oral  
Surg. Oral Med. Oral Pathol., 39: 87-102, 1975.