



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MORFOLOGIA EM QUADROS DE ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA LÍNGUA

Sofia Lynn Coelho
2016-2017
Professor Doutor António Silvério Cabrita
Mestre Dr^a Ana Rute Duarte

Trabalho de final de curso apresentado à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita (Universidade de Coimbra) e da Mestre Dr^a Ana Rute Duarte (Universidade de Coimbra).

“Tenho pensamentos que, se conseguisse realizá-los e torná-los vivos, acrescentariam uma nova luz às estrelas, uma nova beleza ao mundo e um maior amor ao coração dos homens.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A realização deste trabalho final de curso contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita expresse a minha sincera gratidão, pela oportunidade que me deu, de colaborar neste estudo clínico no Serviço de Patologia Experimental, permitindo-me a realização deste trabalho para conclusão do meu mestrado.

À Mestre Dr^a Ana Rute Duarte, serei sempre agradecida pela sua sempre pronta disponibilidade em me ouvir, tirar dúvidas, palavras de incentivo e fazer sentir capaz de realizar este trabalho. Ser-lhe-ei sempre agradecida pela transmissão de conhecimentos e organização que contribuíram para a melhoria e realização deste trabalho.

À Dr^a Catarina Talina e ao Dr Eduardo Costa a minha enorme gratidão pela sempre pronta disponibilidade, pelo acompanhamento, apoio e conhecimentos transmitidos nos laboratórios de Patologia Experimental, sem os quais este trabalho não seria realizado.

Aos meus colegas, que desde o início sempre me deram palavras de apoio e incentivo, obrigada.

Ao meu namorado, melhor amigo, companheiro, confidente e marido, Joaquim, a minha maior e mais eterna gratidão pelo total e incondicional apoio e incentivo em nunca desistir dos meus sonhos. Sem ti, o teu amor, carinho, luz e risada dia e noite, jamais seria capaz de chegar aqui.

Por fim, aos meus maiores e melhores amigos, que cuidaram de mim desde o primeiro dia, me transmitiram todos os valores, amor, carinho, palavras amigas e de incentivo, que nunca desistiram de mim, avós guerreiros que são tudo para mim, dedico-vos este trabalho final com o maior amor.

A ti, bebé, obrigada por vires a caminho para dar uma nova luz e cor à vida.

Índice

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Materiais e Métodos	13
Resultados	14
Discussão e Conclusão	17
Bibliografia	18
Anexos	21

Resumo

O objectivo deste trabalho é avaliar a influência do 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) nas alterações histológicas da língua.

Neste estudo foram utilizados 20 ratos, fêmeas, da estirpe Spaque-Dawley com 48 dias no início do estudo. Os ratos foram divididos por dois grupos, com 10 animais cada um. O grupo I constitui o grupo controlo, mantido durante 6 meses sem qualquer manipulação indutora de alterações. O grupo II, grupo teste, foi submetido à administração de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), aos 55 dias de idade, em dose única de 65mg/Kg, por gavagem.

Ao final de período de 6 meses todos os animais foram sacrificados, fazendo-se seguidamente a respectiva necropsia e analisadas as línguas ao microscópio.

O DMBA nas condições estudadas não interfere significativamente com a língua em termos histomorfológicos.

Palavras-Chaves: Rato, língua, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), grupo controlo, grupo teste.

Abstract

The goal of this study is to evaluate the influence of 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) in histological alterations of the tongue.

For this study were used 20 female Spaque-Dawley rats with 48 days at the beginning of the study. The rats were distributed into two groups, of 10 animals each one. Group I is the control group, maintained for 6 months without any inducing manipulation modifications. Group II, the test group, was subjected to the administration of 7,12-dimethyl-benzanthracene (DMBA) in one dosage, at 55 days of age, in a dose of 65mg/Kg, by gavage.

After a period of 6 months all the animals were sacrificed subsequently being made their necropsy and analyzing each tongue microscopically.

In the studied conditions the DMBA does not significantly interfere with the tongue in histomorphological terms.

Keywords: Rat, tongue, 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), control group, test group.

Introdução:

A **língua** é um órgão formado por musculatura estriada esquelética que faz parte do sistema digestivo, revestida por uma membrana mucosa com uma estrutura que varia de acordo com a região^{1,17}. Este órgão é essencial para o início do processo digestivo, moldando e guiando o bolo alimentar, além de, também estar relacionado com o sentido do paladar e da formação de fonemas na fala^{1,17}. A língua contém papilas que são elevações do epitélio oral e lâmina própria que assumem diversas formas e funções^{1,17}.

Histologicamente, a superfície dorsal da língua, é coberta por mucosa de revestimento e, a submucosa por uma camada inserida no músculo subjacente^{1,17}. O epitélio é de espessura fina, não-queratinizada e com papilas pequenas e numerosas^{1,17}. O sulco terminal é a zona que divide a língua em dois terços anteriores e um terço posterior^{1,17}. Os dois terços anteriores estão cobertos por uma mucosa especializada que tem importantes funções gustativas e constituídos por epitélio espesso e queratinizado, cobertos por numerosas papilas identificadas em quatro tipos: *filiformes*, *fungiformes*, *circunvaladas* e *caliciformes*^{1,17}. (Figura 1, 2)

As papilas que constituem a língua apresentam diferentes formas e funções:

- Papilas filiformes: de forma cônica alongada, muito numerosas e espalhadas por toda a superfície dorsal da língua. Ricas em queratina e, com poucos botões gustativos;
- Papilas fungiformes: de forma semelhante aos cogumelos, com uma base estreita e porção superior mais achatada e lisa. São papilas com poucos botões gustativos na sua parte superior e que se encontram irregularmente entre as papilas filiformes;
- Papilas foliadas: no Homem estas papilas são pouco desenvolvidas, constituindo apenas duas ou mais rugas paralelas divididas por um sulco que está presente na superfície dorso-lateral da língua. Estas papilas contêm muitos botões gustativos;

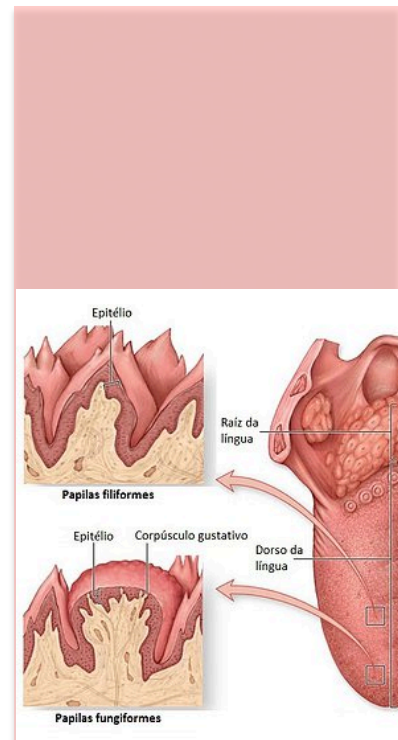


Figura 1 – Localização e forma das papilas filiformes e fungiformes

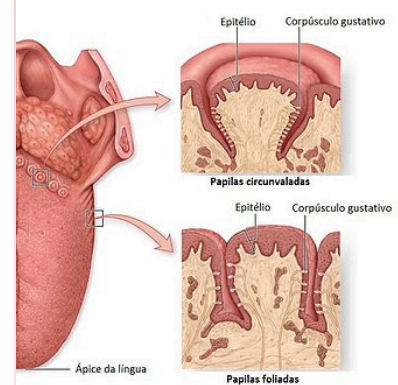


Figura 2 – Localização e forma das papilas circunvaladas e foliadas

- Papilas circunvaladas: com 7 a 12 estruturas circulares grandes a superfície achatada estende-se acima das outras papilas. Estão distribuídas na região do “V” lingual, na parte posterior da língua. Cada uma das papilas circunvaladas está rodeada por diversas depressões onde glândulas serosas e glândulas de von Ebner segregam no interior o que possibilita um fluxo contínuo líquido sobre um grande número de botões gustativos presentes ao longo das superfícies laterais destas papilas, sendo importante na remoção de partículas de alimento presentes ao redor dos botões gustativos. Isto é muito importante no mecanismo de processamento de novos estímulos por essas estruturas. As glândulas de von Ebner também segregam uma lipase que, possivelmente, previne a formação de uma camada hidrofóbica sobre os botões gustativos. Além de desempenhar este papel na língua, quando chega ao estômago, a lipase lingual é ativada podendo digerir até 30% dos triglicerídeos presentes nos alimentos^{1,17}.

O terço posterior da língua é revestido por mucosa gustativa de revestimento, com epitélio de espessura variável geralmente não-queratinizado e pode ou não apresentar pequenas papilas^{1,17}.

Para ensaios clínicos que têm como objecto de estudo neoplasias malignas, são usados agentes de carácter carcinogénico, como o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). (Figura 3)

O **DMBA** é um tóxico que se encontra presente no ar contaminado, em alguns alimentos e também no fumo do Tabaco². Está referido que o consumo do tabaco em seres humanos está relacionado com doenças graves, sendo sugerido que o seu consumo está associado a 70-80% de tumores orais, e que a percentagem aumenta quando associado ao consumo de álcool³. O fumo do tabaco possui 4000 compostos diferentes,

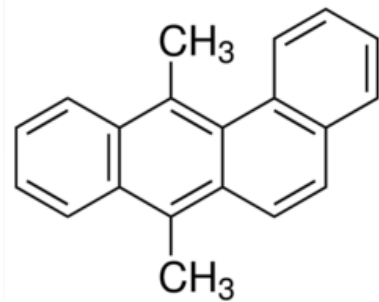


Figura 3 – Estrutura do 7,12-dimetilbenzantraceno - DMBA

sabendo-se até agora que o fumo do tabaco possui 43 tipos de carcinogéneos diferentes^{7,9}. O DMBA encontra-se em grandes concentrações (40-100ng por cigarro) na fracção do alcatrão presente no fumo do “cigarro, sabendo-se que o DMBA produz mutações em oncogénicas e genes supressores que, em última instância levam a uma oncogénese estabelecida histologicamente^{4,5,7,9}. A presença de DMBA durante a proliferação celular dificulta a acção dos mecanismos de reparação do DNA, perpetuando as lesões moleculares^{7,9}.

O DMBA é, um dos agentes carcinogéneos mais potentes conhecidos¹⁴. Pelo seu comportamento pró-oncogénico, tem sido usado na indução de neoplasias da mama^{8,10,11,12}, bem como, em ensaios com indução do tóxico, em quantidades e tempos diferentes, na cavidade oral^{13,15,19,20,21,22,24,25}.

Neste ensaio clínico, a língua vai constituir um dos primeiros tecidos em contacto com a sonda aquando da indução do DMBA via endogástrica. É também, da mesma forma, um dos últimos contactos da sonda na sua retirada. (Figura 4) Este estudo pretende avaliar e verificar se há contacto dos tecidos da língua com o DMBA na indução por gavagem provocando alterações patológicas neste órgão.

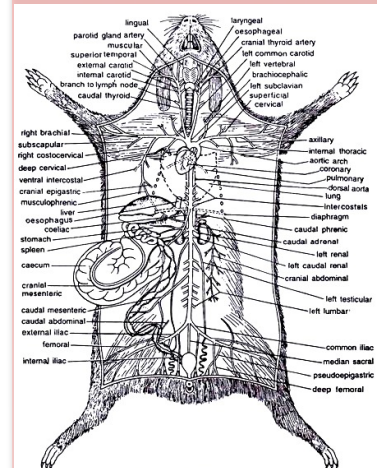


Figura 4 – Anatomia interna do Rato

Materiais e Métodos

Para este estudo foram utilizados 20 ratos, fêmeas, da estirpe Spaque-Dawley (Figura 5) com 48 dias no início. Durante o estudo, os ratos foram mantidos em ambiente de biotério que permitiu assegurar todas as condições ambientais para garantir e respeitar as condições fisiológicas dos animais em estudo, especialmente, a temperatura, a humidade, os ciclos de luz-escuro e as condições do chão das gaiolas. A alimentação e o fornecimento de água dos ratos, foi feito tendo em conta a espécie e, foi feita a manutenção das condições de higiene e stress mínimo dos ratos.

Os ratos foram divididos por dois grupos, com 10 animais cada um. O grupo I - grupo controlo, foi mantido durante 6 meses sem qualquer manipulação indutora de alterações. O grupo II - grupo teste, foi submetido à administração de DMBA, aos 55 dias de idade, em dose única de 65mg/Kg, por gavagem (Figura 6).

O período de estudo foi de 6 meses para todos os animais de forma a esperar que desenvolvam tumores ou alterações em outros órgãos. No final deste período, todos os ratos foram sacrificados fazendo-se de seguida a respectiva necropsia e, de cada rato foi colhida a língua e processada para estudo detalhado.

Os tecidos foram inicialmente fixados em formol, tamponado a 10%, e, de seguida, foram impregnadas em parafina e feita a inclusão de cada língua em blocos individuais e identificados de 1/17 E3 a 20/17 E3. Fizeram-se cortes de cada bloco num micrótomo e utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para todas as lâminas.

A análise histo-morfológica foi feita em fotografias das línguas, coradas pela HE, com ampliação de 4x e μm . Para esta análise foi utilizado o programa de processamento de fotografias microscópicas *ImageJ*. Foram feitas as medições da altura, para cada lâmina, desde a camada basal à última camada do epitélio, na face dorsal e na face ventral. Com estes elementos foram calculadas para cada lâmina a média de alturas e desvio padrão tendo em conta a face ventral e dorsal, do grupo I e grupo II.



Figura 5 – Rato de Estirpe Spaque-Dawley

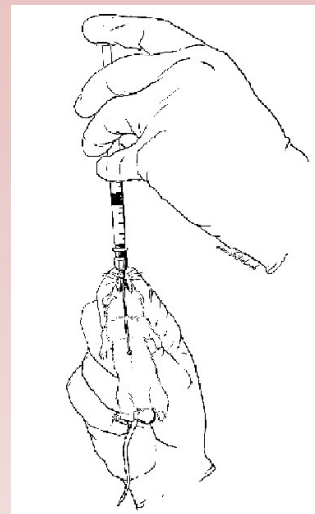


Figura 6 – Método de administração por gavagem

Resultados

Calcularam-se 10 medições da altura, para cada lâmina, desde a camada basal à última camada do epitélio, com 5 medições da altura para cada face da língua (Tabela I, II em anexo). Com estes elementos, foram calculadas para cada lâmina a média de alturas e desvio padrão tendo em conta a face dorsal e ventral, do grupo I e grupo II.

As medições de altura para o grupo I, controlo, dão um valor médio aproximado de $\cong 1460.2\mu\text{m}$ para a face dorsal e de $\cong 871.3\mu\text{m}$ para a face ventral (Tabela III). Para o grupo II, teste, a média da altura é de $\cong 1779\mu\text{m}$ para a face dorsal e de $\cong 755.1\mu\text{m}$ para a face ventral (Tabela IV).

Tabela III: Média de alturas – Lâminas do grupo I (controlo)

GRUPO I - CONTROLO			
DORSAL		VENTRAL	
Lâmina	Altura Média	Lâmina	Altura Média
1/17 E3	1669.12	1/17 E3	1055.8
2/17 E3	1059.52	2/17 E3	1156.32
3/17 E3	1474.44	3/17 E3	726.68
4/17 E3	1589.06	4/17 E3	817.5
5/17 E3	1352.1	5/17 E3	664.48
6/17 E3	1524.2	6/17 E3	851.74
7/17 E3	1898.92	7/17 E3	1245.7
8/17 E3	1157.34	8/17 E3	705.56
9/17 E3	1446.64	9/17 E3	884.14
10/17 E3	1430.62	10/17 E3	604.98
Altura Média Total:	1460.196	Altura Média Total:	871.29

Grupo I - Controlo

Face dorsal: $\cong 1460.2\mu\text{m}$
Face ventral: $\cong 871.3\mu\text{m}$

Grupo II - Teste

Face dorsal: $\cong 1779\mu\text{m}$
Face ventral: $\cong 755.1\mu\text{m}$

Tabela IV: Média de alturas – Lâminas do grupo II (teste)

GRUPO II - TESTE			
DORSAL		VENTRAL	
Lâmina	Altura Média	Lâmina	Altura Média
11/17 E3	1318.76	11/17 E3	764.9
12/17 E3	2061.6	12/17 E3	579.24
13/17 E3	1617.26	13/17 E3	802.38
14/17 E3	2269.54	14/17 E3	1470.5
15/17 E3	1281.48	15/17 E3	631.74
16/17 E3	1367.66	16/17 E3	567.9
17/17 E3	1596.26	17/17 E3	632.44
18/17 E3	2334.16	18/17 E3	797.36
19/17 E3	2205.7	19/17 E3	707.5
20/17 E3	1737.94	20/17 E3	597.24
Altura Média Total:	1779.036	Altura Média Total:	755.12

Para se perceber o grau de variação das medidas recolhidas calculou-se o desvio padrão para cada grupo, na face dorsal e na face ventral.

No grupo I, a média total do desvio padrão dá um valor aproximado de $\cong 211.9$ para a face dorsal e de $\cong 109.1$ para a face ventral (Tabela V). Para o grupo II, a média total do desvio padrão é de $\cong 214.4$ para a face dorsal e de $\cong 126.8$ para a face ventral (Tabela VI).

Tabela V: Média de desvio – Lâminas do grupo I (controle)

GRUPO I - CONTROLO			
DORSAL		VENTRAL	
Lâmina	Desvio Padrão	Lâmina	Desvio Padrão
1/17 E3	198.6760101	1/17 E3	154.3160879
2/17 E3	69.25140432	2/17 E3	146.0196802
3/17 E3	416.1860557	3/17 E3	167.9129298
4/17 E3	211.163889	4/17 E3	69.25698521
5/17 E3	196.6550025	5/17 E3	125.8225417
6/17 E3	64.85834565	6/17 E3	123.3220702
7/17 E3	451.5083133	7/17 E3	65.85305612
8/17 E3	133.1562729	8/17 E3	146.7833369
9/17 E3	256.7098907	9/17 E3	47.77162338
10/17 E3	121.3727399	10/17 E3	43.98644109
Média Total:	211.9537924	Média Total:	109.1044753

Grupo I - Controlo

Face dorsal: $\sigma \cong 211.9$

Face ventral: $\sigma \cong 109.1$

Grupo II - Teste

Face dorsal: $\sigma \cong 214.5$

Face ventral: $\sigma \cong 126.8$

Tabela VI: Média de desvio – Lâminas do grupo II (teste)

GRUPO II - TESTE			
DORSAL		VENTRAL	
Lâmina	Desvio Padrão	Lâmina	Desvio Padrão
11/17 E3	164.5622466	11/17 E3	106.3028457
12/17 E3	127.5106074	12/17 E3	95.547046
13/17 E3	98.54835361	13/17 E3	92.59188409
14/17 E3	237.476542	14/17 E3	223.4712174
15/17 E3	73.05071526	15/17 E3	143.2503333
16/17 E3	115.8785053	16/17 E3	92.08615531
17/17 E3	606.2183501	17/17 E3	139.7031424
18/17 E3	140.981286	18/17 E3	181.8062513
19/17 E3	357.687035	19/17 E3	128.3783471
20/17 E3	222.6462733	20/17 E3	64.4606314
Média Total:	214.4559915	Média Total:	126.7597854

Os valores de média total de alturas em ambas as faces, para os dois grupos têm valores aproximados (Tabela VII). O mesmo se verificou para os valores de desvio padrão calculados para os dois grupos (Tabela VIII)

Então, comparativamente, nos grupos I e II a avaliação histológica da língua mostrou não existirem alterações histomorfológicas. (Figura 7, 8, 9 e 10)

Microfotografias da Língua

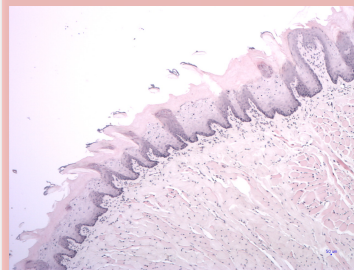


Figura 7- Microfotografia, Grupo Controle, Face Dorsal He, 4x.

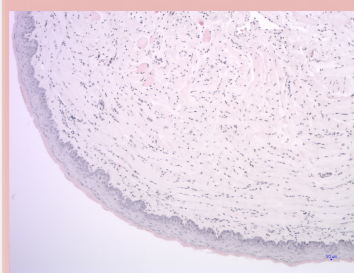


Figura 8- Microfotografia, Grupo Controle, Face Ventral, He, 4x.

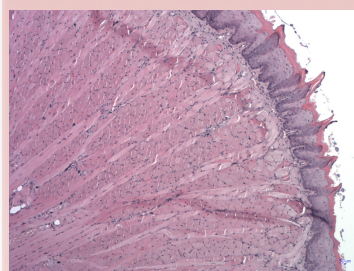


Figura 9- Microfotografia, Grupo Teste, Face Dorsal He, 4x.

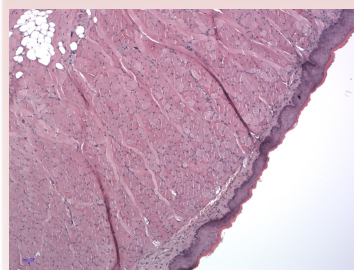


Figura 10- Microfotografia, Grupo Teste, Face Ventral, He, 4x.

Discussão e Conclusão

A administração de DMBA por gavagem pode induzir o contacto não intencional e contaminação dos tecidos por parte desta substância na cavidade oral.

Este estudo mostrou que, os 10 ratos do grupo teste desenvolveram todos tumores da mama, contudo, os resultados encontrados nas medidas calculadas, para cada face lingual nas 20 línguas colhidas para análise histo-morfológica, mostram que os valores são aproximados quer para os animais do grupo controlo, quer para os animais do grupo teste concluindo desta forma que não existiu desenvolvimento de patologia neste órgão, no tempo deste ensaio clínico nem com a quantidade de substância administrada.

Tendo ficado demonstrado neste estudo que a administração por gavagem não levou a desenvolvimentos tumorais nem alterações patológicas na língua, seria igualmente interessante perceber se a indução directa da substância no órgão levaria a alguma reacção nos tecidos e a desenvolvimento de patologia tumoral.

Tabela VII- Média total de altura

Média total de altura	
Grupo I - Dorsal	≅1460.2µm
Grupo II - Dorsal	≅1779µm
Grupo I - Ventral	≅871.3µm
Grupo II - Ventral	≅755.1µm

Tabela VIII- Média total de desvio padrão

Média total de Desvio Padrão	
Grupo I - Dorsal	211.9
Grupo II - Dorsal	214.5
Grupo I - Ventral	109.1
Grupo II - Ventral	126.8

! O médico dentista é um profissional de saúde, responsável pelo estudo, prevenção, diagnóstico e tratamento das anomalias e doenças dos dentes, boca, maxilares e estruturas anexas.

! O médico dentista, pelo contacto regular com os seus doentes, encontra-se numa posição privilegiada para contribuir no rastreio precoce e prevenção do cancro oral.

Bibliografia

1. Carneiro, J., Junqueira, L.C. et al "Histologia Básica", 10ª Edição, 281-282
2. Thakur, P. & Sanyal, S. N. "Induction of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats by a single dose of 9, 10 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and the chemopreventive role of diclofenac". *Experimental and molecular pathology* 88, 394–400 (2010).
3. Suresh, K., Manoharan, S., Vijayaanand, M. A. & Sugunadevi, G. "Modifying Effects of *Annona Squamosa* Linn on Glycoconjugates Levels in 7, 12- Dimethylbenz (A) Anthracene (DMBA) Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis". *Journal of Applied Sciences Research*, 6(8): 973-979, 2010.
4. Roemer, E. et al. "Cytotoxicity, mutagenicity, and tumorigenicity of mainstream smoke from three reference cigarettes machine- smoked to the same yields of total particulate matter per cigarette". *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47, 1810– 8 (2009).
5. Lee, L. L., Lee, J. S. C., Waldman, S. D., Casper, R. F. & Grynopas, M. D. "Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model". *Bone* 30, 917–23 (2002).
6. Corominas, M. et al. "Ras Activation in Human Tumors and in Animal Model Systems". *Environmental health perspectives* 93, 19– 25 (1991)
7. Bersch (2006); Efeito da nicotina Injectável e da Fumaça do Cigarro em um Modelo Experimental de Lesões Intra-epiteliais e de Adenocarcinoma Pancreático Induzidos por 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) em Camundongos; Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia
8. 19.Jung et al (2006); Purple Grape Juice Inhibits 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced Rat Mammary Tumorigenesis and in Vivo DMBA-DNA Adduct Formation; *Cancer Letters*; Vol. 233; 279-288
9. Lee et al (2002); Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Cigarette Smoke Cause Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model; *Bone*; Vol. 30 (6); 917-923
10. Currier et al (2005); Oncogenic Signaling Pathways Activated in DMBA-induced Mouse Mammary Tumors; *Toxicologic Pathology*; Vol. 33; 726-737
11. Scheneider et al (2002); Effects of DMBA Preparation on DMBA-induced Rat Mammary Carcinogenesis; *Polycyclic Aromatic Compounds*; Vol. 22; 831-839
12. Macejová et al (2001); Chemically Induced Carcinogenesis: a Comparison of 1- Methyl-1-Nitrosourea, 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene, Diethylnitroso-amine and Azoxymethan Models (Minireview); *Endocrine Regulations*; Vol. 35; 53-59
13. Sun et al (2008); Chemoprevention of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)- induced Oral Carcinogenesis in Hamster Cheek Pouch by Topical Application of a Dual Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and ErbB2 Tyrosine Kinases; *Oral Oncology*; Vol. 44; 652-657

14. Russo, J. Basis of Cellular Autonomy in the Susceptibility to Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 11, 149–166 (1983)
15. Fujita K, Kaku T, Sasaki M, Onoe T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site of formation. *J Dent Res.* 1973; 2: 1177-85.6.
16. Mcmillan, D. C., Fu, P. P. & Cerniglia, C. E. "Stereoselective Fungal Metabolism of Resolution of a K-Region Dihydrodiol". 53, 2560–2566 (1987)
17. Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R., Moxham, B.J. et al "Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal". 3ª Edição, 243-246
18. Animesh Mandal, Anupam Bishayee (2015) *Trianthema portulacastrum* Linn. Displays Anti-Inflammatory Responses during Chemically Induced Rat Mammary Tumorigenesis through Simultaneous and Differential Regulation of NF-κB and Nrf2 Signaling Pathways
19. Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1993; 7: 285-91.4.
20. Fathy LM. Induction of mesenchymal neoplasms by DMBA implantation in deep lingual submucosa of male albino rats. *Egypt Dent J.* 1993; 39: 491-4.5.
21. Heller B, Kluffinger AM, Davis NL, Quenville NF. A modified method of carcinogenesis induction in the DMBA hamster cheek pouch model of squamous neoplasia. *Am J Surg.* 1996; 172: 678-80.
22. Marefat P, Shklar G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 44: 578-86.
23. McMillan MD, Smillie AC. Scanning electron microscopy of dimethylbenzanthracene (DMBA)-treated hamster cheek pouch. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 14-9.
24. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in hamster cheek pouch. *J Dent Res.* 1961; 40:3-15.
25. Renstrup G, Smulow JB, Glickman I. Effect of chronic mechanical irritation on chemically induced carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Am Dent Assoc.* 1962; 64: 770-7.

Anexos

Tabela I: Medição de alturas – Lâminas do grupo I (controlo)

GRUPO I - CONTROLO							
DORSAL				VENTRAL			
Lâmina 1/17 E3		Lâmina 6/17 E3		Lâmina 1/17 E3		Lâmina 6/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1495.3	1	1539.2	1	1214.4	1	848.5
2	1437	2	1570.6	2	810	2	1037.7
3	1871.8	3	1410.5	3	1024	3	705.2
4	1848.4	4	1541.6	4	1087.1	4	788.3
5	1693.1	5	1559.1	5	1143.5	5	879

Lâmina 2/17 E3		Lâmina 7/17 E3		Lâmina 2/17 E3		Lâmina 7/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	946.1	1	2639.4	1	971.4	1	1279.1
2	1133.9	2	1912.1	2	1380.3	2	1239.3
3	1067.6	3	1875.1	3	1159.8	3	1203.2
4	1064	4	1539.2	4	1133.1	4	1169
5	1086	5	1528.8	5	1137	5	1337.9

Lâmina 3/17 E3		Lâmina 8/17 E3		Lâmina 3/17 E3		Lâmina 8/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1319.5	1	994.1	1	827.3	1	882.8
2	2134.1	2	1090.4	2	920.3	2	685.4
3	1542.6	3	1261.4	3	776.8	3	818.6
4	1007.8	4	1117.9	4	513.5	4	621
5	1368.2	5	1322.9	5	595.5	5	520

Lâmina 4/17 E3		Lâmina 9/17 E3		Lâmina 4/17 E3		Lâmina 9/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1415.1	1	1470.9	1	736.4	1	886.1
2	1779	2	1771	2	766.3	2	816.4
3	1406.6	3	1317.3	3	823.8	3	900.2
4	1852.4	4	1578.9	4	848.8	4	948
5	1492.2	5	1095.1	5	912.2	5	870

Lâmina 5/17 E3		Lâmina 10/17 E3		Lâmina 5/17 E3		Lâmina 10/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1209.2	1	1606.8	1	616.6	1	579
2	1294.2	2	1321.4	2	831.9	2	550.7
3	1690.9	3	1501.9	3	487.9	3	650.7
4	1225.6	4	1387.2	4	683.1	4	595.5
5	1340.6	5	1335.8	5	702.9	5	649

Tabela II: Medição de alturas – Lâminas do grupo II (teste)

GRUPO II - TESTE							
DORSAL				VENTRAL			
Lâmina 11/17 E3		Lâmina 16/17 E3		Lâmina 11/17 E3		Lâmina 16/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1569.8	1	1337.1	1	870	1	618.5
2	1361.8	2	1314.9	2	789.5	2	702.9
3	1289.8	3	1291.9	3	827.3	3	474.3
4	1247.3	4	1321.5	4	594	4	530.3
5	1125.1	5	1572.9	5	743.7	5	513.5
Lâmina 12/17 E3		Lâmina 17/17 E3		Lâmina 12/17 E3		Lâmina 17/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	2186.6	1	2637.4	1	577.1	1	540.8
2	2080.6	2	1408.6	2	417.9	2	782.3
3	2180.1	3	1335.8	3	666.1	3	523.9
4	1947	4	1531.2	4	616.6	4	788.3
5	1913.7	5	1068.3	5	618.5	5	526.9
Lâmina 13/17 E3		Lâmina 18/17 E3		Lâmina 13/17 E3		Lâmina 18/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1654.8	1	2388.3	1	902.5	1	660.7
2	1727.5	2	2083.9	2	740	2	870
3	1462.6	3	2413.2	3	684.1	3	552
4	1594.8	4	2372.2	4	803	4	962.1
5	1646.6	5	2413.2	5	882.3	5	942
Lâmina 14/17		Lâmina 19/17 E3		Lâmina 14/17 E3		Lâmina 19/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	2659.2	1	2531.6	1	1127.7	1	720
2	2227.4	2	2005.3	2	1533.2	2	743.7
3	2263.6	3	2536.5	3	1635.1	3	823.8
4	2181.2	4	2253.1	4	1677.5	4	761.6
5	2016.3	5	1702	5	1379	5	488.4
Lâmina 15/17 E3		Lâmina 20/17 E3		Lâmina 15/17 E3		Lâmina 20/17 E3	
Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura	Microfotografia	Altura
1	1245.1	1	1736	1	471	1	488.4
2	1230	2	1816.5	2	484.7	2	610.8
3	1401.5	3	1793.2	3	726.2	3	618.5
4	1230.4	4	1371.7	4	776.8	4	607.8
5	1300.4	5	1972.3	5	700	5	660.7