



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



VINÍCIUS DE PAIVA GONÇALVES

**AÇÃO DO CURCUMIN SOBRE OS PERÍODOS
INICIAIS DA CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA
POR 4-NQO EM MODELO MURINO**

ARARAQUARA

2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



VINÍCIUS DE PAIVA GONÇALVES

**AÇÃO DO CURCUMIN SOBRE OS PERÍODOS
INICIAIS DA CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA
POR 4-NQO EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

ARARAQUARA

2014

Gonçalves, Vinícius de Paiva.

Ação do curcumin sobre os períodos iniciais da carcinogênese bucal induzida por 4-NQO em modelo murino / Vinícius de Paiva Gonçalves
- Araraquara: [s.n.], 2014.
83 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório

1. 4-Nitroquinolina-1-Óxido 2. Ratos 3. Língua 4. Curcumina 5.
Marcadores biológicos de tumor I.Título

VINÍCIUS DE PAIVA GONÇALVES

**Ação do curcumin sobre os períodos iniciais da
carcinogênese bucal induzida por 4-NQO em modelo
murino**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio.

2º examinador: Prof. Dr. Helio Massaiochi Tanimoto.

**3º examinador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici
Marcantonio.**

Araraquara, 10 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

VINÍCIUS DE PAIVA GONÇALVES

NASCIMENTO: 06.10.1989 – Uberaba / MG

FILIAÇÃO: José Augusto Gonçalves da Silva

Ionice Paiva da Silva Gonçalves

2007 – 2010: Curso de Graduação em Odontologia

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB

2010 – 2010: Curso de Atualização em Periodontia

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB

2012 – 2014: Curso de Pós-Graduação em Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, *José Augusto Gonçalves da Silva e Ionice Paiva da Silva Gonçalves*, que como maior incentivo durante esta minha jornada, caminharam arduamente ao meu lado.

Foram incansáveis! E jamais mediram esforços ou questionaram-se sobre qualquer sacrifício por mim realizado. Pelo contrário, são incontáveis os momentos em que abdicaram de suas necessidades em realização às minhas.

À vocês, que sempre incitaram-me o desejo de evoluir e buscar ser a cada dia um ser humano melhor. Não melhor que o próximo, mas ao que era ontem! Tornando-me apto a oferecer o que de melhor possuir, às minhas ações.

À vocês, que são meus melhores mestres. Que um dia me mostraram um caminho, o do bem! E através de seus exemplos, por ele me ensinaram a caminhar e um verdadeiro ser humano me tornar.

Obrigado Pai, por todas as vezes em que disse: “Deus jamais desampara alguém, principalmente o homem bom!”. Obrigado Mãe, pelos inúmeros momentos em que não cansou de repetir: “Com paciência e humildade, a gente chega lá!”. Todo esse amor, carinho e incentivo, foram imprescindíveis durante a trajetória do Mestrado; e sempre apegado a esses melhores sentimentos, os quais me ensinaram, fui caminhando e batalhando em busca de minhas metas. E hoje, por meio deste, concluo mais uma etapa.

E os agradecimentos são meus! À vocês, meus queridos pais, agradeço a compreensão em todas as minhas escolhas, e incentivo à conquista delas.

Recebam este trabalho como retribuição por toda dedicação e amor que sempre a mim dispensaram. Essa conquista é nossa! **AMO MUITO VOCÊS!!**

“Uma das coisas mais importantes na educação de um filho, é levá-lo a admirar seu educador.” *(Augusto Cury)*

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por prover a vida e nela ser tão generoso, proporcionando diversas oportunidades de evolução, e durante esta trajetória jamais me ver sem seu amparo.

Aos meus queridos avós, *Francisco* (*in memoriam*), *Jerônima*, *José Nilton* e *Maria Lúcia* (*in memoriam*), que independente do convívio conseguiram transmitir todo seu amor e carinho, e sempre com extrema simplicidade e humildade me fizeram aprender os verdadeiros valores do ser humano. Jamais irei esquecê-los!! Amo muito vocês!

À minha família paterna e materna... Meus queridos tios, padrinhos, primos e afilhados, que sempre estiveram na torcida, transmitindo excelentes vibrações, e muitas vezes participando diretamente desta minha caminhada. A união e amor de vocês são imprescindíveis!

À *Adriana Cabrera Ortega* (Adrianita)... Sinceramente, as palavras me faltam para descrever o que representa na minha história de vida! Nesses dois anos de convivência construímos uma relação indescritível, nos tornamos melhores amigos, e sempre caminhando lado a lado cumprimos nossa tarefa da melhor forma possível! Sempre com muita alegria, companheirismo e responsabilidade, auxiliamos um ao outro na luta diária do Mestrado. São muitas coisas a agradecê-la, e muito tenho a agradecer a Deus pela sua amizade. Obrigado pela nossa convivência fraterna! Adoro você!

Ao orientador, *Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório*, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento, e por toda a confiança e credibilidade na realização deste trabalho, o qual não seria possível sem sua orientação. Agradeço de coração, por acreditar em minhas capacidades, e pela amizade!

À *Walkyria Lacerda Oliveira* (Wal), minha amiga de sempre e para sempre; irmã de alma e coração. Em você sempre encontro a solução de tantas coisas, a paz que necessito e o ombro verdadeiramente amigo. Mesmo distante, sua presença fraterna sempre se faz presente. Amo muito você!

À *Dayana Cancilieri*, pessoa especial em minha vida. Obrigado pelo carinho e amizade. Adoro você!

A todos os amigos de Conceição das Alagoas, os quais não citarei por receio de esquecer alguém. Agradeço pela amizade e carinho, sempre acompanhando minha caminhada. Adoro vocês!

Aos amigos que conquistei ao longo da minha jornada em Uberlândia... *Carla Bizone*, *Geane Godim*, *Kamilla Tavares* e *Luciano Correia*. À vocês, que desde o momento em que decidi iniciar o

Mestrado, até o fim, estiveram ao meu lado torcendo, acreditando e almejando como se fosse de vocês essa conquista. Fazem toda diferença! Adoro-os!

Aos queridos **amigos da XXIV Turma do Curso de Odontologia de Barretos**, meus eternos amigos. Agradeço sempre pela amizade e carinho.

À **Nayara Cardoso Garcia**, minha companheira, amiga e meu braço direito durante a graduação. Seu carinho, amizade e fraternidade são incomparáveis, e estarão comigo para sempre. Adoro você minha amiga!!

À querida **Thais Lopes Sugui** (Gigante), minha amiga e companheira. Em você, vejo a amizade em sua melhor definição! Obrigado pelo carinho de sempre, adoro você!

À **Leni Maria Vieira**, que incomparavelmente sempre representará o papel de uma Mãe! Agradeço por todos os momentos de convivência e carinho. Amo você!

Às minhas queridas e admiráveis Prof^{as} **Ana Emília Pontes** e **Patrícia Helena Rodrigues**, exemplos vivos de humildade e competência, que fortemente influenciaram nesta escolha profissional. Agradeço as oportunidades a mim oferecidas e o empenho dispensado durante meu aprendizado. Obrigado pela amizade, vocês são espetaculares!

Aos queridos professores e toda equipe do Curso de Odontologia de Barretos, por todo incentivo e carinho de sempre para com minha pessoa. São incomparáveis!

Aos amigos **Ana Carolina Venção** (Carol), **Miriam Magro** (Miris) e **Tiago Fonseca** (Titis), que em Araraquara constituíram-se minha família. Nesses dois anos compartilhamos momentos alegres e divertidos, e outros nem tantos assim; consolamos um ao outro nos momentos saudosos de casa, e em diversas situações nos vimos como irmãos. Agradeço imensamente pela amizade, cumplicidade e fraternidade. Adoro vocês!

À **Leila Coimbra** e **João Paulo Steffens**, pela colaboração nas atividades do biotério, inclusive outras as quais atenderam prontamente!

Aos amigos do Mestrado... **Adriana Cabrera**, **Cássio Rocha**, **Elton Pichonato**, **Fabiana Curylofo**, **Fernanda Florian**, **Haline Carneiro**, **Jackeline Tsurumaki**, **Lélis Nicoli**, **Lígia Araújo**, **Patrícia Maquera**, **Paula Macedo (Paulinha)**, **Rafael Nepomuceno**, **Sâmara Tfaile**, **Suzane Pigossi**, **Vinícius**

Ibiapina... Companheiros incansáveis durante esta caminhada. Agradeço a amizade, os momentos de diversão e colaboração em vários momentos que necessitei. Adoro vocês!

A todos os demais amigos da Pós-graduação, por toda a colaboração em muitas circunstâncias que de ajuda necessitei, e sempre atenderam prontamente. Obrigado pela amizade também!

À querida amiga *Lívia Moretti*, por todo o carinho. Adoro você!

Ao *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*, grande colaborador no estabelecimento e desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade de sempre, e paciência dispensada durante os ensinamentos.

Aos Professores Doutores do Curso de Mestrado em Periodontia... *Adriana Marcantonio, Carlos Rossa, Daniela Zandim, Elcio Marcantonio, Joni Augusto, José Eduardo Sampaio*. Agradeço pelo acolhimento e ensinamentos durante esses dois anos em Araraquara. Acompanharão sempre minha caminhada!

À *Morgana Guimarães* (Morgs) e *Fabiana Curylofo* (Fabi) pela imprescindível colaboração neste trabalho. Por todos os momentos de ensinamento no Laboratório, e pela amizade.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e da Periodontia... *Dona Maria, Cláudia, Isabela, Leandro, Maria José, Priscila e Regina Lúcia*. Agradeço toda atenção e disponibilidade!

Aos queridos *José Zuanon* e *Juliana Pirola* pela imprescindível e incomparável colaboração na realização deste trabalho, e pela amizade!

Aos Professores e toda equipe do Departamento de Fisiologia e Patologia.

Ao *Adriano Palomino de Oliveira*, por todo o auxílio nas atividades do biotério.

Aos queridos *Mara Cândida Munhoz do Amaral, José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier*, pela acessibilidade e disponibilidade em atender toda e qualquer necessidade. São imprescindíveis! Obrigado pela paciência.

À Diretoria da FOAr-UNESP, agradeço a estrutura proporcionada à realização do Curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários da FOAr-UNESP que em vários momentos, e às vezes de forma anônima, fizeram a caminhada menos árdua. Muito Obrigado!

À **CAPES**, pelo apoio financeiro, imprescindível ao decorrer do Curso.

“ Agradeço a todas as dificuldades enfrentadas. Não fossem por elas não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar, e mesmo as críticas nos auxiliam, e muito! ”

(Chico Xavier)

“Creio em mim mesmo. Creio naqueles que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos. Creio nas orações, e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”

Mahatma Gandhi

Gonçalves VP. Ação do curcumin sobre os períodos iniciais da carcinogênese bucal induzida por 4-NQO em modelo murino [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

O Curcumin apresenta potencial terapêutico no tratamento e prevenção de doenças crônicas, inclusive câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto do tratamento sistêmico do curcumin sobre os períodos iniciais da carcinogênese bucal induzida pelo 4-NQO em ratos. Quarenta ratos distribuídos em quatro grupos (n=10) foram tratados com solução de 50 ppm de 4-NQO dissolvido na água de beber *ad libitum* durante todo período experimental, que ocorreu em 8 e 12 semanas, sendo que dois desses grupos foram tratados com 30 ou 100 mg/kg de peso corporal de curcumin diariamente por gavagem oral, e um grupo tratado com veículo no volume correspondente à maior dose de curcumin. Os animais do grupo controle negativo (n=10) foram sacrificados no início do experimento. Os cortes histológicos, provenientes da língua dos animais, foram corados por H&E ou submetidos à reação de imunohistoquímica para detecção de PCNA, Bcl-2, SOCS1 e -3, e STAT3. Parte das peças foi utilizada para a verificação da expressão de Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1 por RT-qPCR. O tratamento com 100mg/kg de peso corporal de curcumin por 12 semanas, principalmente, diminuiu os valores do H-score de PCNA, Bcl-2, SOCS3, STAT3, enquanto aumentou SOCS1, além de reduzir as atipias celulares observadas na análise morfológica do epitélio lingual. A expressão dos genes avaliados por RT-qPCR também foi reduzida pelo tratamento com curcumin, independentemente da dose utilizada. Os resultados do presente estudo demonstram que o curcumin acaba por intervir e atenuar o desenvolvimento do processo carcinogênico.

Palavras-chave: 4-Nitroquinolina-1-Óxido, Ratos, Língua, Curcumina, Marcadores biológicos de tumor.

Gonçalves VP. Action of curcumin on the initial stages of oral carcinogenesis induced by 4-NQO in a murine model [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Curcumin has therapeutic potential in the treatment and prevention of chronic diseases , including cancer. The aim of this study was to evaluate the impact of systemic treatment of curcumin on the initial periods of oral carcinogenesis induced by 4 - NQO in rats. Forty rats were distributed into four groups (n = 10) and treated with 50 ppm of 4-NQO solution dissolved in the drinking water *ad libitum* throughout the experimental period, which occurred at 8 and 12 weeks , with two of these groups were treated with 30 or 100 mg / kg body weight daily by oral gavage curcumin, and a group treated with vehicle corresponding to larger dose of curcumin volume. The animals in the negative control group (n = 10) were sacrificed at the beginning of the experiment. Histological sections, from the tongue of animals, were stained with H&E or subjected to immunohistochemical analysis for detection of PCNA, Bcl-2, SOCS1 and -3, and STAT3. Part of the pieces was used to check the expression of vimentin, Cdh1, Cdh2 and TWIST by RT - qPCR . Treatment with 100mg/kg body weight of curcumin for 12 weeks, mainly, decreased the values of the H -score of PCNA, Bcl-2, SOCS3, STAT3 , while increased SOCS1 , and reduce cellular atypia observed in the morphological analysis of lingual epithelium. The gene expression assessed by RT-qPCR was also reduced by treatment with curcumin, regardless of the dose used. The results of this study demonstrate that curcumin eventually intervene and attenuate the development of the carcinogenic process.

Keywords: 4-Nitroquinoline-1-oxide, Rats, Tongue, Curcumin, Tumor markers biological.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 (Marcador anti-apoptótico)

Cdh1: E-caderina

Cdh2: N-caderina

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CEC: Carcinoma espinocelular

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMT: Transição epitelial-mesenquimal

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H&E: Hematoxilina e Eosina

HHC: Hexahidrocurcumin

HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático

MAPK: Proteína Kinase ativada por mitógeno

OSCC: Carcinoma oral de células escamosas

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR: Polymerase chain reaction (Reação de polimerase em cadeia)

RNA_m: Ácido Ribonucleico mensageiro

RNase: Ribonuclease

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RT-qPCR: Real Time quantitative polymerase chain reaction

SOCS1: Supressor de sinalização de citocina 1

SOCS3: Supressor de sinalização de citocina 3

STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

THC: Tetrahidrocurcumin

TWIST1: Fator básico de transcrição 1

4-HAQO: 4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido

4-NQO: Óxido de nitroquinolina

Δ CT: Comparativo C_T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Alvos como perspectivas para intervenção no processo de carcinogênese	20
2.2 Vias moleculares relacionadas à carcinogênese	21
2.2.1 PCNA e Bcl-2	21
2.2.2 STAT e SOCS	22
2.2.3 TWIST1 e Vimentina	23
2.2.4 Caderinas	24
2.3 Curcumin	25
2.3.1 Histórico	25
2.3.2 Vias de administração, absorção e metabolismo	25
2.3.3 Atividade anti-neoplásica	26
2.4 Carcinogênese oral experimental pelo Óxido de Nitroquinolina (4-NQO)	28
3 PROPOSIÇÃO	29
3.1 Hipótese	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 Animais	32
4.2 Tratamento com Curcumin	32
4.3 Observações macroscópicas	33
4.4 Observações microscópicas	34

4.5	Imunohistoquímica	35
4.6	Expressão gênica de RNAm - RT-qPCR em tempo real	36
4.7	Análise dos resultados	37
5	RESULTADO	38
5.1	Peso Corporal dos Animais	39
5.2	Avaliação Macroscópica	39
5.3	Avaliação Microscópica (H&E)	39
5.4	Análise imunohistoquímica	46
5.5	PCR em tempo real	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	82



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Classicamente as lesões pré-malignas da cavidade oral são constituídas por epitélio de revestimento que pode estar morfológicamente e funcionalmente afetado, cujo risco de transformação maligna é maior quando comparado a um tecido clinicamente saudável (Mithaini et al.⁵³, 2007). As alterações morfológicas e funcionais, responsivas aos gatilhos genéticos e ambientais no início da transformação de uma lesão pré-maligna em maligna, são caracteristicamente precedidas por instabilidade ou alterações genômicas, o que denota que os agentes carcinogênicos que atuam nessa fase da doença, inflijam lesão genética viabilizando o potencial maligno da lesão (Gasche et al.²⁶, 2012).

Embora as bases genéticas das lesões pré-malignas sejam pouco elucidadas, há de se considerar que as mutações que regulam as alterações essenciais para a transformação maligna, como a autossuficiência nos sinais de crescimento, instabilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, manutenção da angiogênese, capacidade de invasão e metástase, e defeitos no reparo do DNA, sejam estudadas. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), genes reguladores de apoptose (Bcl-2), genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS), genes transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1 e Cdh2, e TWIST são exemplos de proteínas envolvidas na carcinogênese de forma geral e merecem atenção quando se aborda a transformação de lesão pré-maligna oral em maligna (Feng et al.²⁴, 2013; Ohara et al.⁶¹, 2013; Placzek et al.⁶⁷, 2010; Rong et al.⁷², 2013; Wang et al.⁹², 2013).

Nesse sentido, para se estabelecer uma estratégia eficaz no tratamento ou prevenção do desenvolvimento do câncer é essencial identificar aspectos característicos da doença e ao mesmo tempo identificar proteínas ou marcadores relacionados. A identificação ou

desenvolvimento de drogas químicas ou fitoterápicos propõe novas modalidades terapêuticas àquelas já estabelecidas para tais finalidades. Tratamentos alternativos, ainda que experimentalmente aplicados, acenam de modo positivo no sucesso da involução ou inibição da transformação de alguns tipos de tumores. Um dos fitoterápicos amplamente estudados em carcinoma já estabelecido é o curcumin, um composto polifenólico derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, que demonstra excelente tolerância e ausência de efeitos secundários e não desejáveis quando administrado sistemicamente em diferentes dosagens (Guimarães et al.³⁰, 2011; Guimarães et al.³¹, 2012). O curcumin inibe a proliferação celular e estimula a apoptose em linhagens celulares de câncer bucal de células escamosas (Aggarwal et al.⁴, 2004; Sharma et al.⁷⁴, 2006), age como um potencializador dos efeitos apoptóticos de agentes quimioterápicos (Kamat et al.³⁸, 2007) e reduz a expressão de STAT3 (Weissenberger et al.⁹³, 2010).

Levando-se em consideração o fato do curcumin ser promissor adjuvante no tratamento do câncer de modo geral, incluindo o carcinoma de cavidade oral, elaborou-se a hipótese sugerindo que esse fitoterápico poderia ter um papel importante nos processos iniciais da carcinogênese bucal experimental induzida pelo óxido de nitroquinolina (4-NQO).



REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alvos como perspectivas para intervenção no processo de carcinogênese

O esforço para combater o câncer levou a muitas descobertas fundamentais no campo da biologia celular, inclusive de várias proteínas que possuindo anormalidades na sua função podem levar a um crescimento descontrolado das células, aumento da divisão, diminuição da morte celular, ou outras características aberrantes das células cancerosas. Essas proteínas podem estar envolvidas na reparação do DNA, na sinalização, ciclo e crescimento celular, bem como na morte programada das células (Alberts et al.⁵, 2008)

Portanto, conhecendo-se a existência de eventos biomoleculares envolvidos ao desenvolvimento e progressão do processo carcinogênico, o entendimento dos mecanismos que resultam na transformação de uma célula normal em neoplásica perpassa sobre as alterações moleculares, que por sua vez, envolvem proteínas sinalizadoras intracelulares. Com o advento de novas técnicas de biologia molecular, oportunidades adicionais têm sido proporcionadas para ampliar, por exemplo, a compreensão dos mecanismos subjacentes da progressão das lesões displásicas para carcinoma oral de células escamosas (OSCC). Dessa forma, através da possibilidade de identificação de alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento displásico, necessárias para proceder de forma irreversível o OSCC, torna-se possível o desenvolvimento de terapias específicas. Assim, o processo de transformação maligna pode ser detido ou mesmo revertido (Brennan et al.¹⁰, 2007).

Nesse contexto, onde a carcinogênese envolve diferentes vias moleculares e centenas de moléculas desreguladas, incluindo fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, fatores de transcrição, e genes que regulam a apoptose e proliferação, o curcumin pode ser estabelecido como perspectiva para intervenção no processo de

carcinogênese, por ter demonstrada sua atividade sobre várias moléculas envolvidas nesse processo (Shishodia et al.⁷⁵, 2007).

2.2 Vias moleculares relacionadas à carcinogênese

A carcinogênese, como descrito por Kumar et al.⁴³ (2013), envolve a aquisição de algumas alterações essenciais na fisiologia celular: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, contínua angiogênese, e a invasão de tecidos e metástases. Nesse âmbito, atuam alguns genes reguladores como os proto-oncogenes promotores de crescimento, genes supressores de tumor, inibidores do crescimento, genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e genes envolvidos no reparo do DNA (Kumar et al.⁴³, 2013). Envolvidas a esses mecanismos, a atividade e propriedades de algumas proteínas específicas, como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), reguladores de apoptose (Bcl-2), supressores de sinalização de citocinas (SOCS), transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT3), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST, vêm sendo atribuídas ao desenvolvimento e progressão do câncer (Liu et al.⁴⁸, 2010; Ogata et al.⁶⁰, 2006; Ohara et al.⁶¹, 2013; Placzek et al.⁶⁷, 2010; Wang et al.⁹², 2013; Yuen et al.⁹⁶, 2007; Zhang et al.⁹⁸, 2013).

2.2.1 PCNA e Bcl-2

O *Antígeno nuclear de proliferação celular* (PCNA) atua como coordenador no recrutamento de proteínas moleculares envolvidas na síntese de DNA, no controle do ciclo celular, e na resposta e reparo a danos ao DNA (Komatsu et al.⁴², 2000; Paunesku et al.⁶⁶, 2001; Maga et al.⁴⁹, 2003; Zhao et al.¹⁰⁰, 2012). Em seu trabalho, Rong et al.⁷² (2013) pesquisaram a atividade do PCNA em animais com câncer, e observaram a expressão da proteína nos núcleos das células durante a fase de síntese de DNA do ciclo celular,

constituindo um importante marcador indicador da proliferação do tumor, demonstrando ainda, menor atividade da proteína nos grupos de animais que receberam tratamento e obtiveram uma menor progressão do câncer (Rong et al.⁷², 2013).

Paralelo à proliferação celular, a apoptose (morte celular programada) é outro mecanismo essencial ao processo carcinogênico, apesar de as células cancerosas desenvolverem a capacidade de evitá-la por meio da regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e / ou de regulação negativa de vias de sinalização pró-apoptóticas, destacando-se a família de ambas as proteínas pró e anti-apoptóticas de Bcl -2, reguladoras centrais dos mecanismos de apoptose (Placzek et al.⁶⁷, 2010). Este gene, Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), é um proto-oncogene descoberto originariamente por análise de translocação cromossomal associada ao linfoma folicular de células B, e quando ativado atua suprimindo a apoptose (Bakhshi et al.⁸, 1985; Tsujimoto et al.⁸⁷, 1985).

2.2.2 STAT e SOCS

Ainda, associados aos mecanismos de proliferação e morte celular programada, encontram-se os *Transdutores de sinais e ativadores de transcrição* (STAT), um grupo de fatores de transcrição latente no citoplasma celular constituindo-se de sete diferentes membros (Darnell¹⁸, 1997), dentre os quais se destaca o STAT3 por contribuir com a sobrevivência e crescimento celular através de um aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 (Shishodia et al.⁷⁵, 2007). Portanto, os fatores de transcrição STAT e, especialmente STAT3, desempenham um papel vital na iniciação e progressão do câncer (Buettner et al.¹¹, 2002; Pardoll et al.⁶⁵, 2009), apresentando elevada atividade em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Grandis et al.²⁹, 1998; Shishodia et al.⁷⁵, 2007); estando sua expressão relacionada ao SOCS3, principal regulador negativo supressor da sinalização de citocina (Wang et al.⁹², 2013). A remissão da expressão de

SOCS3, como descrito por Ogata et al.⁶⁰ (2006), conduz à hiperativação de STAT3 podendo contribuir no processo de carcinogênese e desenvolvimento de neoplasias malignas através da indução de múltiplos genes onco-promotores (Ohara et al.⁶¹, 2013).

O *Supressor de sinalização de citocinas*, SOCS3, assim como SOCS1, são proteínas da mesma família classificadas como reguladoras negativas das vias de sinalização STAT (Yasukawa et al.⁹⁵, 2000) e, por meio dessa atividade estão relacionadas no processo de desenvolvimento de câncer (Ohara et al.⁶¹, 2013). SOCS3 é considerado supressor de tumor, estando silenciado em diversos tipos de cânceres humanos, dentre eles o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; e quando restaurada sua expressão, tem sido relatada a supressão do crescimento de células de vários tipos de tumores em humanos (Isomoto³⁶, 2009; Molavi et al.⁵⁴, 2013; Tokita et al.⁸⁶, 2007).

A proteína SOCS1 em alguns casos apresenta expressão elevada em algumas células tumorais e, em outros, sua expressão está silenciada (Zhang et al.⁹⁷, 2012). Ainda, pode influenciar a transdução de sinais proliferativos através da regulação STAT atuando na sobrevivência, diferenciação e transformação celular como descrito por Cooper et al.¹⁷ (2010) (Zhang et al.⁹⁷, 2012).

2.2.3 TWIST1 e Vimentina

O *TWIST1* constitui-se de um regulador mestre da migração celular e reorganização do tecido durante a embriogênese (Castanon, Baylies¹³, 2012), onde além de desempenhar papel central no desenvolvimento normal, encontra-se implicado em vários tipos de carcinomas, e a sua sobre-expressão correlacionada com a progressão de tumores e fenótipos malignos. Portanto, desempenha papel fundamental na progressão de um tumor primário para a fase metastática (Zhang et al.⁹⁹, 2007), induzindo a transição de célula epitelial em mesenquimal,

e promovendo a invasão das células cancerosas, ambos os passos importantes na progressão do câncer (Yuen et al.⁹⁶, 2007; Silva et al.⁷⁷, 2012).

Relacionada também ao processo de transição da célula epitelial para mesenquimal (EMT), está a *vimentina*, que é um filamento de tamanho intermediário altamente expresso em células mesenquimais onde normalmente é encontrada, embora por vezes sua expressão ocorra em células epiteliais migratórias, tais como durante a embriogênese e a cicatrização de feridas (Liu et al.⁴⁸, 2010). Sua expressão em células epiteliais bucais foi patologicamente associada à invasão tumoral e metástases (Liu et al.⁴⁸, 2010; Mandal et al.⁵⁰, 2008; Nijkamp et al.⁵⁷, 2011), o que sugere seu envolvimento na invasão ou migração de células epiteliais, sendo portanto, utilizada na identificação de células cancerosas em processo de transição epitelial para mesenquimal (Liu et al.⁴⁸, 2010, Nijkamp et al.⁵⁷, 2011).

2.2.4 Caderinas

As caderinas são moléculas de adesão celular, que têm um papel importante na morfogênese tecidual, desempenhando importante papel na adesão celular e formando junções aderentes entre as células de determinando tecido (Marie, Hay⁵², 2013).

A família das caderinas engloba diferentes tipos de moléculas, destacando-se as E-caderinas (Cdh1- caderina epitelial) e N-caderinas (Cdh2 – caderina mesenquimal), que compartilham muitas características estruturais e funcionais, participando no estabelecimento da adesão célula-célula dependente de cálcio (Zhang et al.⁹⁸, 2013). Portanto, estão também relacionadas ao processo de transição da célula epitelial para mesenquimal, considerando-se que uma das características dessa transição é a diminuição de adesões célula-célula, que ocorre especialmente devido à redução da E-caderina e caracteriza a invasão de células cancerosas (Zhang et al.⁹⁸, 2013).

2.3 Curcumin

2.3.1 Histórico

Curcumin é um composto polifenólico derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, evidenciado por diversos trabalhos in vitro, in vivo e clínicos como um fitoterápico de grande eficácia terapêutica em diversificada gama de doenças crônicas destacando-se alguns tipos de cânceres (pele, pâncreas e câncer hematológico) (Teiten et al.⁸⁵, 2010; Zhang et al.⁹⁷, 2012; Zong et al.¹⁰¹, 2012), sendo as propriedades anti-neoplásicas desse turmérico descritas pela primeira vez por Kuttan et al.⁴⁴ (1985) através de cultura de tecidos, além de estudos in vivo em camundongos demonstrando a inibição do crescimento de câncer e redução do desenvolvimento de tumores; e ainda, o mesmo autor descreveu essa atividade anti-neoplásica em humanos em 1987 (Aggarwal et al.³, 2013).

Desde então, os efeitos antineoplásicos do curcumin tem sido estudados intensamente, e diversos mecanismos biológicos descritos (Aggarwal et al.¹, 2003; Ravindran et al.⁶⁹, 2009).

2.3.2 Vias de administração, absorção e metabolismo

O curcumin é particularmente interessante para aplicações terapêuticas, devido os seus efeitos anti-proliferativos serem potentes e ocorrerem em concentrações micromolares; sendo sua administração descrita por via intravenosa (Zou et al.¹⁰², 2013), intraperitoneal (Swarnakar et al.⁸², 2005) ou oral (Guimarães et al.³⁰, 2011), esta a forma mais comumente utilizada.

Entretanto, muitos estudos em camundongos, ratos e seres humanos revelaram uma baixa biodisponibilidade do curcumin (Aggarwal², 2007; Goel et al.²⁸, 2008), limitando sua aplicação clínica, o que se deve também à sua baixa solubilidade em água, rápido

metabolismo pelo fígado e parede intestinal, e degradação em pH fisiológico (Bisht et al.⁹, 2010). O curcumin, que é estável sob condições ácidas, pode ser estabilizado pelas proteínas do plasma a partir de um pH \geq 6,8 (Wang et al.⁹¹, 1997), sendo rapidamente metabolizado em animais para a forma de tetrahidrocurcumin (THC), hexahidrocurcumin (HHC) e os conjugados de glucoronídeo ou sulfato, que são excretados através da bile e urina (Vareed et al.⁸⁹, 2008; Pan et al.⁶³, 1999) (Zou et al.¹⁰², 2013).

A segurança, tolerabilidade e não toxicidade do fitoterápico, em doses elevadas, estão bem estabelecidas por testes clínicos em humanos (Gupta et al.³⁴, 2012), da mesma forma que demonstra excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais quando administrado em ratos (Guimarães et al.³⁰, 2011).

2.3.3 Atividade anti-neoplásica

O curcumin suprime a ativação de vários fatores de transcrição que estão implicados no processo de carcinogênese (Aggarwal et al.³, 2013), sendo descrito como supressor do crescimento e proliferação de uma grande variedade de linhagens de células tumorais de diferentes origens de tecido, por suprimir as proteínas reguladoras do ciclo celular; estando seu efeito anti-proliferativo dependente do tipo de célula, a concentração do fitoterápico, e duração do tratamento (Shishodia et al.⁷⁵, 2007). Ainda, seu principal mecanismo de atuação na carcinogênese é a indução de apoptose em células tumorais, por atuar diminuindo a expressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, ao mesmo tempo em que eleva a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Aggarwal⁴, 2004). Um dos mecanismos observados na atividade anti-tumoral do curcumin foi a indução de apoptose numa variedade de células cancerosas através da ativação de caspase-3 (Belakavadi et al.⁷, 2005), regulação das vias de sinalização MAPK, como descrevem Javvadi et al.³⁷ (2008) e Nimmannit et al.⁵⁶ (2010) (Cao et al.¹², 2013). Papiez⁶⁴ (2013) em seu estudo, avaliou o papel do curcumin (100 e 200 mg/kg

por gavagem oral) sobre o dano no DNA de células da medula óssea por uma droga específica, e demonstrou que curcumin atenuou significativamente as lesões no DNA, além de reduzir significativamente a quebra da cadeia de DNA. Ainda, como citado na literatura, o curcumin atua reduzindo a expressão de STAT3 e TWIST1 (Weissenberger et al.⁹³, 2010), além de promover apoptose através da diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento de proteínas pró-apoptóticas (Li et al.⁴⁶, 2013).

Embora exista uma grande variedade de trabalhos demonstrando os efeitos anti-tumorais do fitoterápico contra diversos tipos de células cancerosas, especificamente em câncer oral há pouca informação sobre a eficácia e mecanismos moleculares da atuação do curcumin. Contudo, existem evidências de que o curcumin inibe a proliferação e induz apoptose em linhagens celulares de câncer oral de células escamosas (OSCC), sendo estes efeitos dose-dependentes (Aggarwal et al.⁴, 2004; Elattar et al.²², 2000; Sharma et al.⁷⁴, 2006). E ainda, em cultura de células derivadas de carcinoma oral de células escamosas, foi demonstrada a ocorrência de morte celular induzida por mecanismo de autofagia (Kim et al.⁴¹, 2012).

Recentemente, a administração intraperitoneal de curcumin reduziu de forma significativa, embora não dose-dependente, o tamanho de tumores bucais de células escamosas em modelos in vivo de xenoenxerto, efeito este atribuído à inibição da proliferação celular pela paralisação do ciclo celular na fase G2/M, simultaneamente a um aumento da apoptose (Lin et al.⁴⁷, 2010). Estudos in vivo têm revelado a potente ação do curcumin sobre o desenvolvimento de câncer oral, atuando como agente anti-neoplásico em modelos animais de carcinogênese (Li et al.⁴⁵, 2002; Manoharan et al.⁵¹, 2009), inclusive reduzindo de forma acentuada lesões pré-malignas induzidas por 4-NQO, como demonstrado por Tanaka et al.⁸³ (1994). A administração tópica do fitoterápico sobre carcinoma oral em humano proporcionou redução no tamanho da lesão oral, e também melhorias a nível histológico em lesões pré-malignas (Goel et al.²⁷, 2007) (Anand et al.⁶, 2008).

2.4 Carcinogênese oral experimental pelo Óxido de Nitroquinolina (4-NQO)

O óxido de nitroquinolina constitui-se de um carcinógeno químico pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), estando amplamente empregado na produção da carcinogênese experimental em animais devido sua aplicação induzir a formação de estágios sequenciais do processo carcinogênico, proporcionando alterações histológicas e moleculares similares as que ocorrem no ser humano, as quais são possibilitadas pela capacidade do 4-NQO em exercer potente estresse oxidativo intracelular, por gerar 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO), um produto metabólico que se liga ao DNA (Kanojia et al.³⁹, 2006).

Alguns métodos utilizando-se o carcinógeno foram estabelecidos na pesquisa da carcinogênese oral experimental, desde sua aplicação tópica à administração por diluição na água de beber dos animais, e em períodos de tempo variando entre 4 à 12, 20 e 28 semanas (Henriques et al.³⁵, 2011; Nogutti et al.⁵⁹, 2012). As lesões induzidas pelo 4-NQO estão relacionadas ao período de exposição, sendo sua severidade diretamente proporcional ao aumento do tempo, ocorrendo desde hiperplasias, displasias em variados graus, à carcinomas in situ e invasivo (Tang et al.⁸⁴, 2004; Nogutti et al.⁵⁹, 2012); onde além do período de aplicação, a concentração de diluição do 4-NQO também influencia modificando a quantidade e o tempo de aparecimento das lesões (Kanojia et al.³⁹, 2006; Svensson, Heiden⁸¹, 1982; Stleider, Reade⁷⁹, 1984).



PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Hipótese

Diante da assertiva que o curcumin tenha um grande potencial terapêutico por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-tumorais, aventou-se a hipótese que esse pigmento administrado sistemicamente possa agir sobre as fases iniciais da carcinogênese oral induzida pelo 4-NQO.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar in vivo o impacto do tratamento sistêmico com solução de curcumin/óleo de milho sobre as alterações epiteliais induzidas pelo 4-NQO, levando em consideração:

- Análise morfológica de cortes de língua corados por H&E
- Imunomarcção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), de genes reguladores de apoptose (Bcl-2), de genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS1 e 3) e de gene transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3);
- Assim como a expressão gênica por RT-qPCR de Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1.



MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Proc. CEUA nº 14/2012) (Anexo).

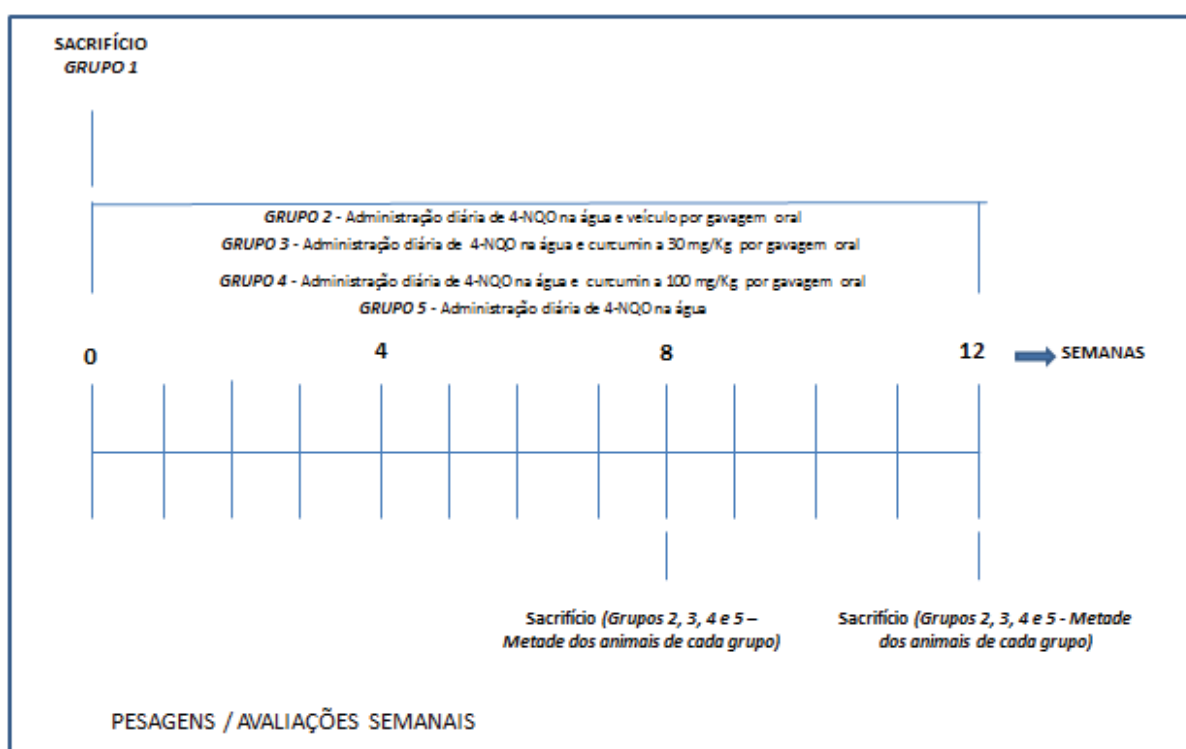
Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), machos, com aproximadamente 3-4 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Campus de Araraquara. Os animais foram aleatoriamente separados em 5 grupos de 10 animais e mantidos em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola) em um ambiente com temperatura (21 ± 1 °C), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12h escuro) controlados, com livre acesso à ração e água. Os animais do grupo controle negativo (grupo 1), que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, foram sacrificados no primeiro dia do experimento (Vered et al.⁹⁰, 2007; Noguti et al.⁵⁹, 2012). Os outros 4 grupos foram submetidos ao tratamento com solução de 4-NQO (Sigma, USA) 50 ppm dissolvida na água de beber durante todo o período experimental, realizado em 8 e 12 semanas. O protocolo de tratamento com 4-NQO se baseia no processo de iniciação, promoção e progressão do tumor no rato, semelhante ao que acontece no ser humano (Ribeiro et al.⁷⁰, 2007).

4.2 Tratamento com Curcumin

Dos quatro grupos submetidos ao tratamento com 4-NQO, dois foram tratados diariamente com 30 mg/Kg (grupo 3) ou 100 mg/Kg (grupo 4) de peso corporal/dia de Curcumin (Sigma / Life Science SLBD0850V) diluído em óleo de milho, via oral. O grupo 2, utilizado como controle ao tratamento com curcumim, foi tratado com óleo de milho no

volume correspondente à maior dose de curcumin; e o grupo 5 não recebeu nenhum tipo de tratamento além da administração de 4-NQO. Guardando os respectivos períodos experimentais, todos os ratos foram sacrificados por aprofundamento anestésico composto por cetamina (80mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição dos grupos de ratos submetidos ou não ao tratamento com 4-NQO. Dos grupos submetidos ao tratamento com 4-NQO, dois grupos foram tratados com 30 ou 100 mg/kg de peso corporal de curcumin, e um grupo com veículo, diariamente, via oral durante todo o experimento. Os ratos foram sacrificados após 8 ou 12 semanas após o início do experimento.



4.3 Observações macroscópicas

Após o sacrifício dos animais do grupo controle negativo e dos grupos experimentais, a língua de cada animal (n=5) foi retirada, fixada em formol tamponado a 10% (pH 7.2) durante pelo menos 48h. Após a fixação realizou-se a análise macroscópica das línguas. Foi

observado se houveram modificações de contorno, alterações de coloração, úlceras e lesões exofíticas. Em seguida as línguas foram lavadas em água corrente por 24h. Após estes procedimentos, as línguas foram incluídas em parafina para obtenção de cortes semi-seriados de 5µm de espessura no sentido longitudinal (ântero-posterior). Foram obtidos 40 cortes da língua, por animal de cada grupo, onde metade dos cortes foi corada com Hematoxilina e eosina (H&E), e a outra metade submetida à reação de imunohistoquímica.

4.4 Observações microscópicas

A análise descritiva dos padrões morfológicos foi realizada com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Carl Zeiss, Germany). De acordo com os achados histológicos as lesões foram classificadas em displasias e suas variações.

Nas regiões que apresentaram displasias, foram adotados os critérios de Smith, Pindborg ⁷⁶ (1969) para avaliação. As alterações do epitélio displásico avaliadas foram: cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, perda de polaridade das células basais, estratificação irregular do epitélio, queratinização de células individuais ou grupos de células da camada espinhosa e perda de coesão celular típica. As alterações das células displásicas avaliadas também seguiram os critérios de Smith, Pindborg ⁷⁶ (1969): núcleos grandes e proeminentes, relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hipercromáticos, pleomorfismo celular, aumento na atividade mitótica, presença de mitoses atípicas.

Na presença de tais alterações, era realizada a classificação quanto à intensidade displásica de acordo com os critérios propostos por Van Der Waal ⁸⁸ (1997):

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

- Displasia severa: alterações desde a camada basal até um nível acima da porção média do epitélio.

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

4.5 Imunohistoquímica

Foram utilizados cortes histológicos da porção posterior da língua de 5 animais por grupo e de ambos os períodos (8 e 12 semanas), para a realização da reação de imunohistoquímica e detecção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), marcadores de apoptose (Bcl-2), bem como supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3), e transdutor de sinais e ativador da transcrição (STAT3). O procedimento para imunohistoquímica foi otimizado para cada anticorpo/proteína alvo: PCNA (1:100 – Invitrogen 133900), Bcl-2 (1:200 – abcam 7973), SOCS1 (1:200 – Santa Cruz Biotechnology 9021), SOCS3 (1:200 – abcam 16030), STAT3 (1:200 – Santa Cruz Biotechnology); e a detecção das proteínas alvo realizada pelo sistema DAB-streptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation). Em síntese, cortes seriados (5 µm de espessura) das peças incluídas em parafina foram obtidos e subsequentemente montados em lâminas silanizadas. As lâminas receberam lamínulas de vidro colocadas com permount, devidamente nas condições a serem observadas e fotografadas com microscópio de luz transmitida comumente. A análise da intensidade da marcação por imunohistoquímica foi realizada pelo método H-score. Para a determinação do H-score, tanto a intensidade (0-3) da marcação positiva quanto a percentual (0-100) de células com marcação positiva de uma determinada intensidade foram levados em consideração. Por exemplo, uma amostra com 10% das células com intensidade 3; 30% das células com intensidade 2; 20% com intensidade 1 e 40% das células não coradas resultará em um H-score

de $110 - (10 \times 3) + (30 \times 2) + (20 \times 1) + (40 \times 0) = 110$. O H-score foi determinado para cada proteína alvo e combinado para cada grupo experimental.

4.6 Expressão gênica de RNAm - RT-qPCR em tempo real

Foram utilizadas amostras de 5 animais por grupo, referentes apenas ao período de 12 semanas. O RNA total referente à parte final da região posterior das línguas coletadas, foi extraído com o *kit* RNeasy MiniR (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. A quantidade e pureza do RNA proveniente das amostras foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita por reação de transcrição reversa (RT) de 300 ng de RNA total utilizando 2.5 µM de primers Oligo (dT)-16 e 1.25 U/µL da transcriptase reversa obtida do vírus da leucemia Moloney de roedores (Moloney murine leukemia virus) na presença de 5.5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTPs e 0.4 U/µL de inibidor de RNase, segundo o protocolo do fabricante (High Capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystems). As reações de PCR foram feitas em placas de 96 poços com um volume final de 20 µL que inclui Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) para cada gene: TWIST1 (twist homolog 1), Rn 00585470_s1; Vim (Vimentin), Rn00579738_m1; Cdh1 (E-cadherin 1), Rn00580109_m1; Cdh2 (N-cadherin 2), Rn00580099; Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), NM008084. As condições das reações de PCR foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, as análises da expressão gênica foram realizadas em duplicata. Para normalizar a quantidade de cDNA total presente em cada reação, a expressão de GAPDH, que não foi alterada pelas condições experimentais, foi usada como controle endógeno por ser um

gene constitutivo. Para comparar os níveis de expressão entre as diferentes amostras, o nível de expressão relativa dos genes foi calculado usando o método comparativo Δ CT utilizando o software da termocicladora.

4.7 Análise dos resultados

Os dados obtidos da análise de imunohistoquímica e da expressão gênica foram analisados através de análise estatística utilizando-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi empregado o teste ANOVA (one-way) e como pós-teste foi utilizado o teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos de determinado período de tempo. Todos os testes desse estudo foram aplicados com nível de confiança de 95 % ($p < 0.05$).



RESULTADO

5 RESULTADO

5.1 Peso Corporal dos Animais

O tratamento com 4-NQO associado ou não com diferentes doses de curcumin ou veículo, não promoveram diferenças significativas no peso corporal dentro dos mesmos períodos experimentais. O ganho de peso corporal de todos os ratos após 8 e 12 semanas apresentou-se uniforme.

5.2 Avaliação Macroscópica

Os animais do grupo controle negativo apresentaram dorso lingual íntegro. Após 8 semanas de tratamento com 4-NQO ou 4-NQO+Veículo, observou-se discreto aumento na rugosidade da superfície dorsal da língua, que foi acentuada após 12 semanas de tratamento. Nesse período todos os animais apresentaram áreas opacas localizadas principalmente nas regiões média e posterior da língua. O tratamento com ambas as doses de curcumin não alterou as características macroscópicas observadas nos grupos tratados 4-NQO. Entretanto, foram alterações imensuráveis, devido ao tênue delimitação de contorno.

5.3 Avaliação Microscópica (H&E)

Microscopicamente, a língua dos ratos do grupo controle negativo apresentava-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com presença de papilas gustativas e botões gustativos adjacentes. Observou-se que na região anterior o epitélio era mais plano, com interdigitações pouco proeminentes e, recoberto por uma delgada camada de queratina. A porção média apresentava discreto espessamento tanto do epitélio quanto da camada de queratina, essa já delineando aspecto de dente de serra.

Na região posterior, região das papilas filiformes, o epitélio projetava-se de forma proeminente com formato de dente de serra que era recoberto por espessa camada de queratina. (Figuras 2A e 3A/ 4A e 5A).

Após 8 semanas de tratamento com 4-NQO ou 4-NQO+Veículo, todos os ratos apresentaram principalmente na região posterior da língua, áreas com displasia epitelial severa. Caracteristicamente, a severidade da displasia epitelial se traduzia pela presença de atipias celulares em todo o estrato epitelial (Figuras 2B e 3B / 2C e 3C). Essas alterações foram atenuadas quando os animais foram tratados com 30mg/Kg e 100mg/Kg de peso corporal de curcumin (Figuras 2D e 3D / 2E e 3E) (Tabela 1).

Após 12 semanas de tratamento com 4 NQO ou 4 NQO + veículo observou-se a permanência da severidade da displasia, e que as atipias celulares eram mais proeminentes quando comparado ao grupo de 8 semanas (Figuras 4B e 5B / 4C e 5C) (Tabela 1). Em um caso, observou-se fenda do epitélio com rompimento da camada granulosa (Figuras 4B e 5B). Após o tratamento com 30mg/Kg de peso corporal de curcumin, apesar de ainda permanecer a severidade da displasia epitelial, observou-se que houve diminuição da presença de atipias celulares nos diferentes estratos do epitélio (Tabela 1); e o tratamento com 100mg/Kg de peso corporal de curcumin acentuou a redução das atipias celulares (Figuras 4D e 5D / 4E e 5E) (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios utilizados na caracterização microscópica das alterações epiteliais encontradas nas línguas dos animais.

Período	Grupos	8 Semanas				
		Controle	4NQO+Veículo	4NQO+30mg Curc	4NQO+100mg Curc	4NQO
8 Semanas	Mitoses anormais aumentadas	X	++	+	-	+
	Hiperplasia das células basais	X	++	+	-	+
	Rete pegs em forma de gota	X	++	++	++	++
	Distúrbio de polaridade das células basais	X	++	++	-	+
	Alteração da relação núcleo citoplasma	X	++	+	-	+
	Hipercromatismo nuclear	X	+	+	-	+
	Núcleo aumentado e proeminente	X	++	+	-	+
	Estratificação epitelial irregular ou distúrbio da maturação	X	++	++	+	+
	Pleomorfismo nuclear e celular	X	+	++	+	+
	Ceratinização anormal	X	+	++	+	+
	Perda ou redução da adesão intercelular	X	++	++	-	+
	12 Semanas					
Período	Grupos	Controle	4NQO+Veículo	4NQO+30mg Curc	4NQO+100mg Curc	4NQO
12 Semanas	Mitoses anormais aumentadas	X	+++	++	++	++++
	Hiperplasia das células basais	X	++	++	++	++++
	Rete pegs em forma de gota	X	+++	+++	++	++++
	Distúrbio de polaridade das células basais	X	+++	++	++	++++
	Alteração da relação núcleo citoplasma	X	++	++++	++	++++
	Hipercromatismo nuclear	X	+++	+++	+++	+++
	Núcleo aumentado e proeminente	X	+++	+++	+++	++++
	Estratificação epitelial irregular ou distúrbio da maturação	X	+++	++	++	++++
	Pleomorfismo nuclear e celular	X	+++	+++	+++	++++
	Ceratinização anormal	X	++	++	+	+++
	Perda ou redução da adesão intercelular	X	++++	++++	++++	+++

Figura 2 – Fotomicrografias referentes à área posterior de língua, dos grupos do período experimental de 8 semanas. Grupo Controle Negativo – Figura **A**; Grupos experimentais – Figura **B** (4-NQO), Figura **C** (4-NQO + Veículo), Figura **D** (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura **E** (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Podem ser observadas nas Figuras **B** e **C** alterações epiteliais acentuadas, com displasia severa; sendo que na imagem **E** podem ser observadas alterações em menor grau. Coloração H.E. x20

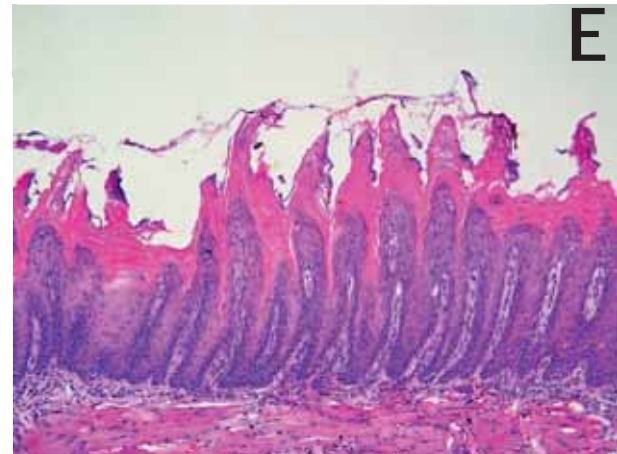
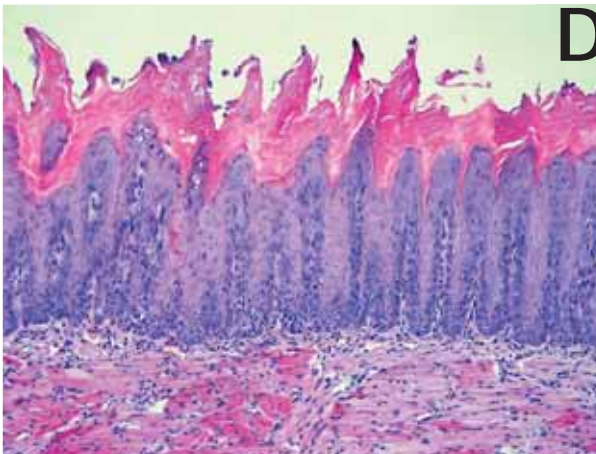
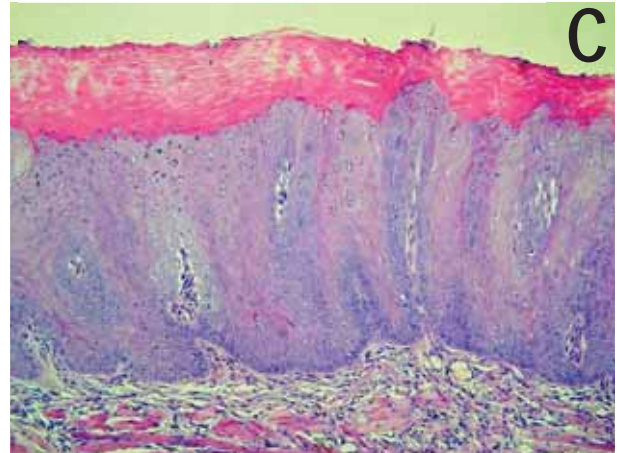
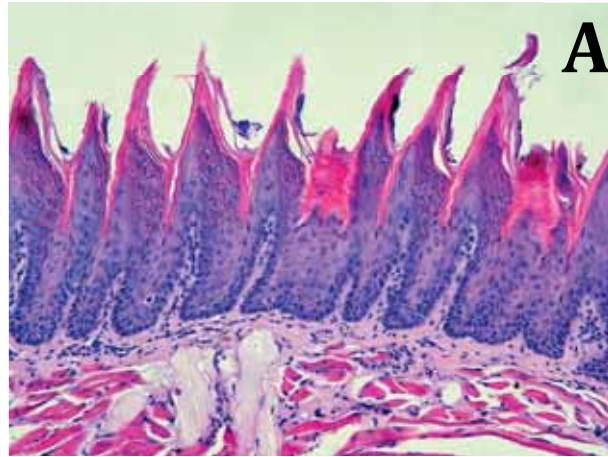


Figura 3 – Fotomicrografias em maiores detalhes, respectivas às figuras dispostas na **FIGURA 2**, referentes à área posterior de língua, dos grupos do período experimental de 8 semanas. Grupo Controle Negativo – Figura **A**; Grupos experimentais – Figura **B** (4-NQO), Figura **C** (4-NQO + Veículo), Figura **D** (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura **E** (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Podem ser observadas nas Figuras **B** e **C** alterações epiteliais acentuadas, com displasia severa, caracterizada por mitoses atípicas estendendo-se até a camada granular, além de relação núcleo/citoplasma aumentada e desorganização das células da camada basal (ver setas), hiperqueratose (*), entre outras; sendo que na imagem **E** podem ser observadas alterações em menor grau, células basais justapostas, menor quantidade de mitoses, evidenciando a acentuada redução dessas atipias celulares. Coloração H.E. x40

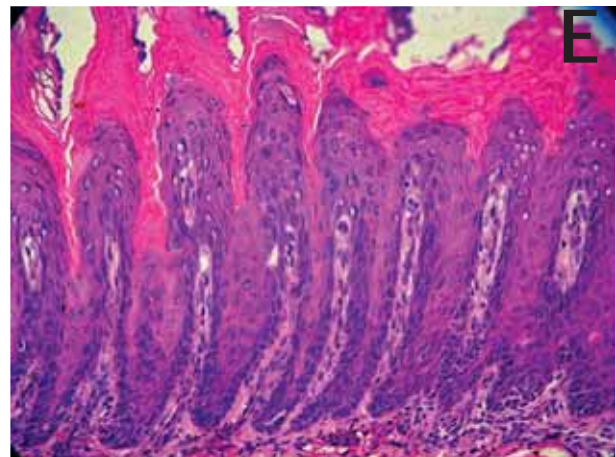
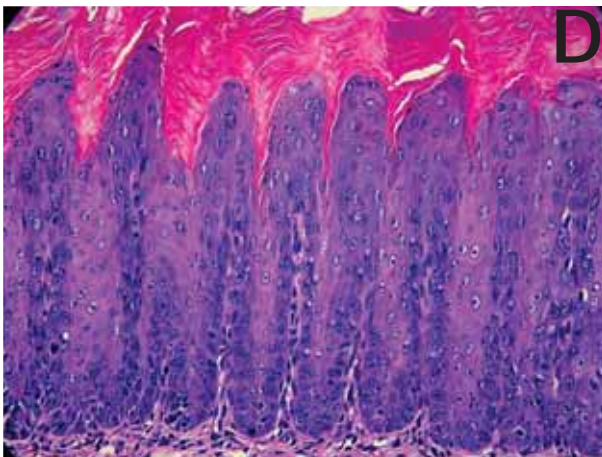
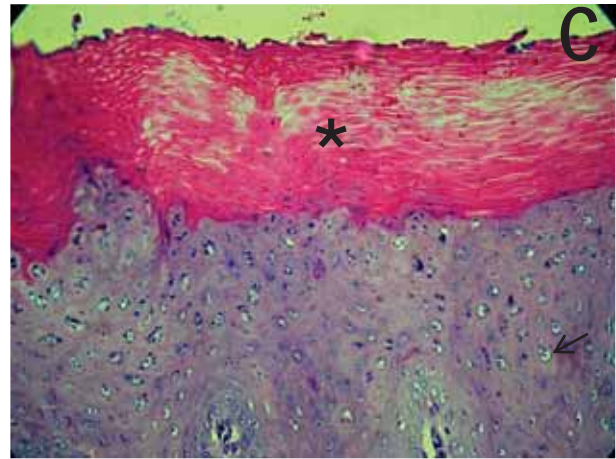
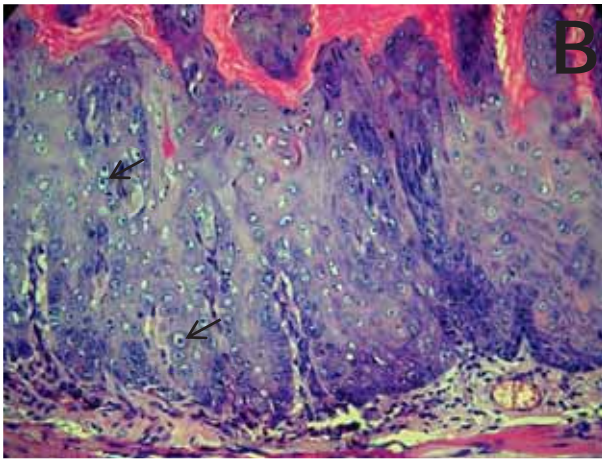
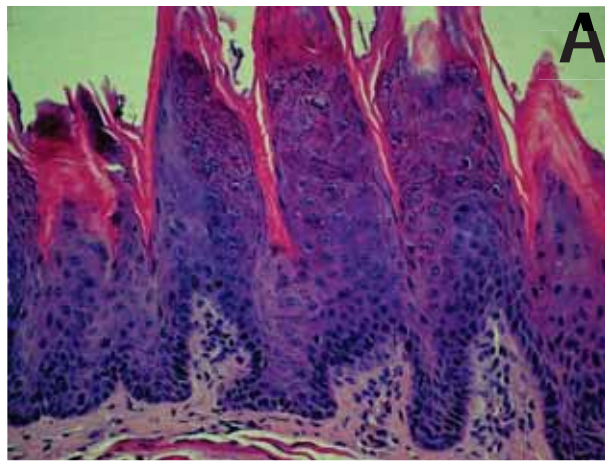


Figura 4 – Fotomicrografias referentes à área posterior de língua, dos grupos do período experimental de 12 semanas. Grupo Controle Negativo - Figura **A**; Grupos experimentais – Figura **B** (4-NQO), Figura **C** (4-NQO + Veículo), Figura **D** (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura **E** (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Neste período experimental podem ser observadas alterações epiteliais mais acentuadas quando comparadas ao período de 8 semanas (representadas nas figuras 2 e 3). E ainda, dentro do período de 12 semanas, numa análise comparativa com os demais grupos submetidos ao 4-NQO, pode-se verificar uma evidente e acentuada redução das alterações epiteliais e atipias celulares no grupo tratado com 100mg/KgCurc. Coloração H.E. x20

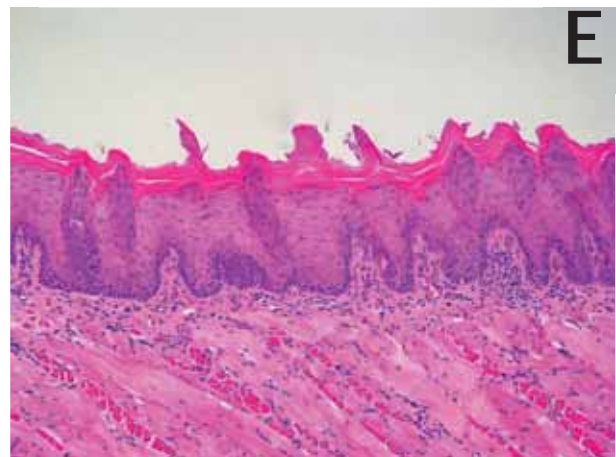
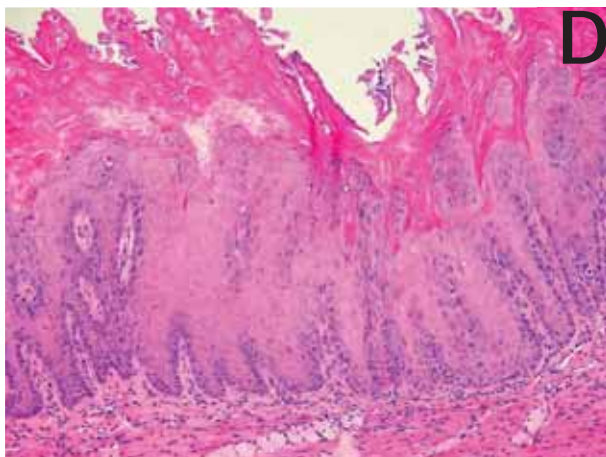
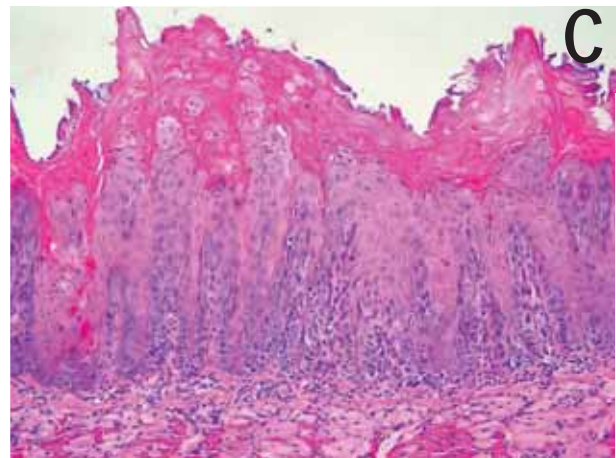
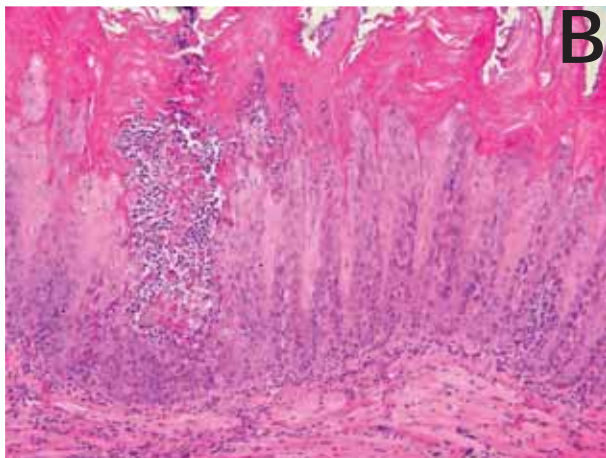
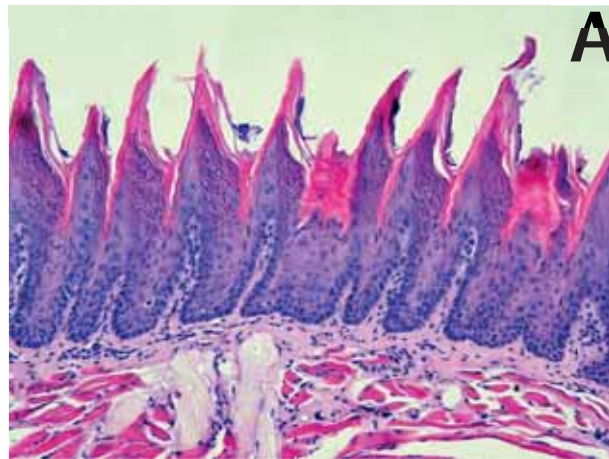
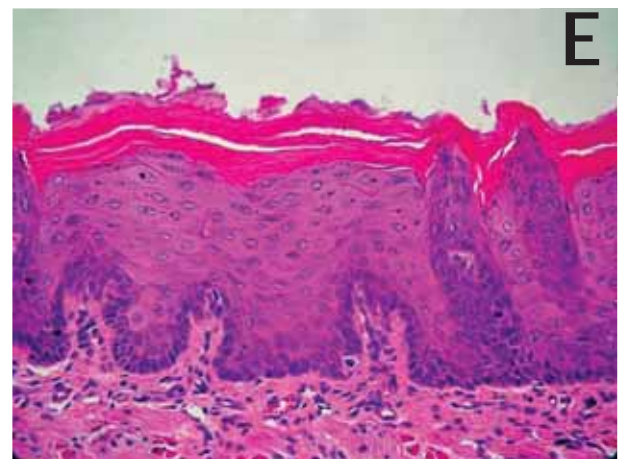
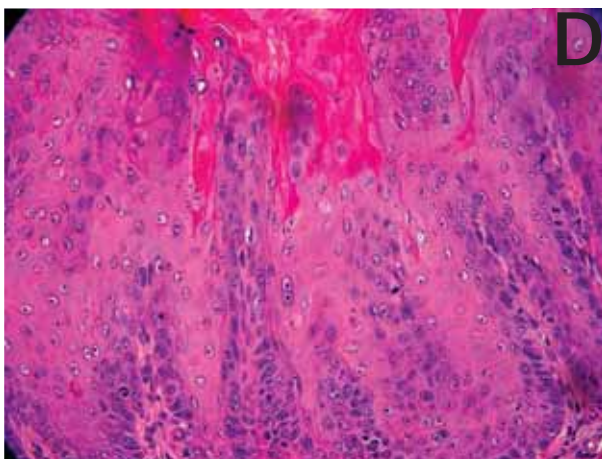
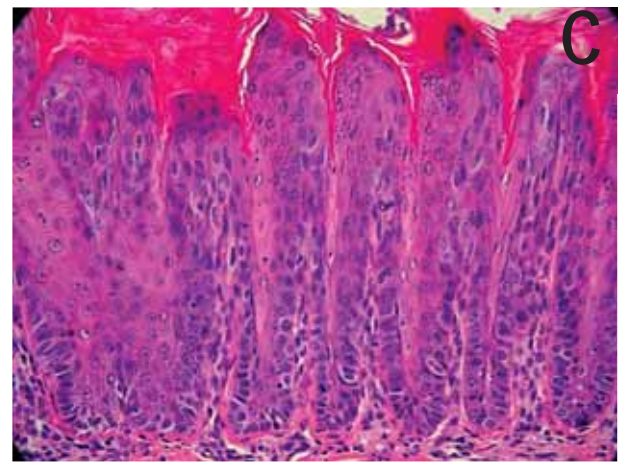
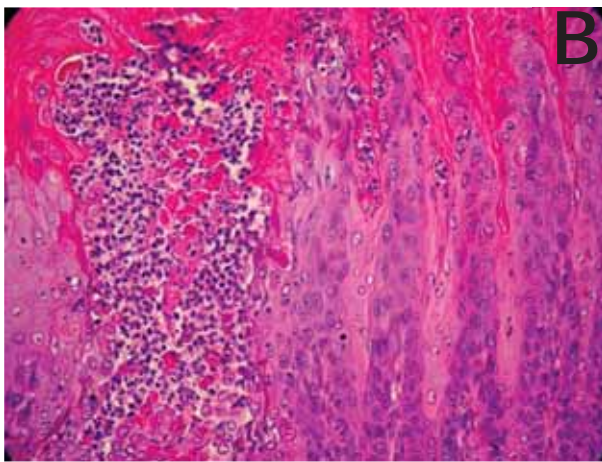
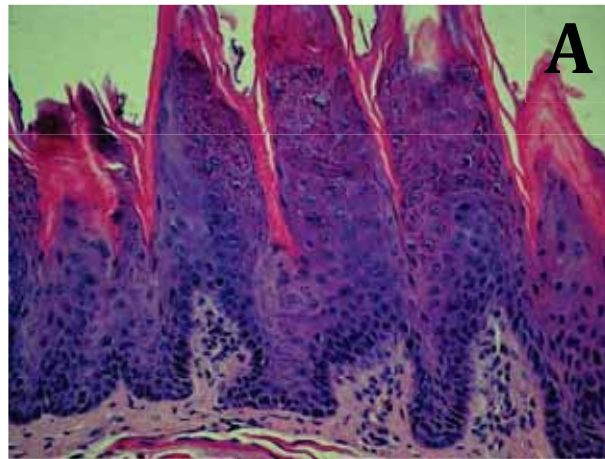


Figura 5 – Fotomicrografias demonstrando maiores detalhes, respectivas às figuras dispostas na **FIGURA 4**, referentes à área posterior de língua, dos grupos do período experimental de 12 semanas. Grupo Controle Negativo - Figura **A**; Grupos experimentais – Figura **B** (4-NQO), Figura **C** (4-NQO + Veículo), Figura **D** (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura **E** (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Pode-se observar na figura **E** alterações epiteliais e atipias celulares, porém com evidente e acentuada redução das mesmas, quando comparado aos demais grupos. Nesse grupo (4-NQO + 100 mg/KgCurc) as células da camada basal já demonstram-se organizadas de forma semelhante ao grupo controle. Coloração H.E. x40



5.4 Análise imunohistoquímica

O *PCNA* apresentou marcação exclusivamente nuclear nas amostras analisadas. As amostras do grupo controle negativo apresentaram H-score = 273% sendo que a marcação foi restrita às células da camada basal. Após 8 e 12 semanas de tratamento com 4-NQO ou 4-NQO+veículo, a marcação para o PCNA aumentou 147% (H-score = 402%)%, 138% (H-score = 378% %), 111% (H-score = 305%) e 96% (H-score = 264%) respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($p > 0.05$).

Independentemente da dose utilizada, o tratamento com curcumin por 8 semanas não alterou significativamente os valores de H-score quando comparado aos grupos tratados com 4-NQO ou 4-NQO+veículo ($p > 0.05$). Após 12 semanas de tratamento com 100mg/Kg de peso corporal de curcumin o valor do H-score (229%) diminuiu quando comparado aos demais grupos, entretanto, os valores foram significativos quando comparado ao grupo tratado com 30mg/kg de peso corporal de curcumin (H-score = 387%) ($p < 0,05$) (Figuras 6 e 7).

Caracteristicamente, a marcação para o *Bcl-2* nas amostras do grupo controle (H-score = 146%) ocorreu em membrana celular das células epiteliais, distribuindo - se igualmente em todos os estratos do epitélio do dorso da língua, da mesma forma que nos grupos experimentais. Após 8 ou 12 semanas de tratamento com 4-NQO ou 4-NQO+Veículo, a marcação para Bcl-2 aumentou 226% (H-score = 331%), 265% (H-score = 387%)%, 210% (307%) e 174% (H-score = 255%) respectivamente, sendo que somente os valores obtidos após 8 semanas de tratamento foram significativos quando comparados ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Independentemente da dose de curcumin administrada por 8 semanas, 30 ou 100 mg/Kg de peso corporal, os valores de H-scores aumentaram significativamente em relação ao grupo controle negativo, 312% (H-score=456%) e 332 % (H-score=486%), respectivamente ($p < 0,05$). Após 12 semanas, a maior dose de curcumin reduziu a marcação

de Bcl-2 comparado aos demais grupos experimentais, porém não foi estatisticamente significante ($p > 0,05$) (Figuras 8 e 9).

A marcação do anticorpo *SOCS1*, que foi em membrana celular, apresentou positividade em 100% das amostras avaliadas no grupo controle (H-score = 45%), ocorrendo nos diferentes estratos do epitélio, assim como no grupo experimental de ambos os períodos. Após 8 semanas, houve aumento significativo de SOCS1 para o tratamento com 4-NQO (251%; H-score = 113%) e 4-NQO+Veículo (70%; H-score = 103%) ($p < 0,05$), enquanto que em 12 semanas a expressão de SOCS1 manteve-se elevada de forma significativa no grupo tratado com 4-NQO (177%; H-score = 80%), comparando-se com o grupo controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento com 30 mg/Kg de peso corporal de curcumin, por 8 semanas, aumentou a expressão do anticorpo em 344% (H-score = 155%) e de forma significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), permanecendo esse aumento, após 12 semanas, em ambos os grupos tratados com 30 (291%; H-score = 131%) e 100 mg/Kg (411%; H-score = 185%) de peso corporal de curcumin, que também ocorreu de forma significativa comparando-se ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figuras 10 e 11).

Para o anticorpo *SOCS3* a imunomarcação ocorreu tanto em membrana citoplasmática quanto citoplasma, e apresentou positividade em 100% dos casos avaliados no grupo controle negativo (H-score = 39%), estando distribuída em todas as camadas epiteliais, demonstrando o mesmo padrão de distribuição nos grupos experimentais de ambos os períodos. No período de 8 semanas, o aumento da expressão de SOCS3 nos tratamentos com 4-NQO (505%; H-score = 197%) e 4-NQO+Veículo (748%; H-score = 292%) diferiu estatisticamente do grupo controle negativo ($p < 0,05$), da mesma forma que no grupo tratado com 4-NQO+Veículo (274%; H-score = 107%) referente ao período de 12 semanas. A expressão de SOCS3 foi significativamente aumentada em 656% em relação ao controle negativo, com a dose de 30 mg/Kg de peso corporal de curcumin (H-score = 256%) após 8 semanas ($p < 0,05$), e reduzida,

porém de forma não significativa, no grupo tratado com a maior dose de curcumin (464%; H-score = 181%) ($p > 0,05$). Após 12 semanas, a expressão de SOCS3 foi reduzida de forma significativa para o tratamento com 100mg/Kg de peso corporal de curcumin (H-score = 19%), em relação aos grupos tratados com 4-NQO+Veículo (H-score = 107%) e 30 mg/Kg de peso corporal de curcumin (H-score = 93%) ($p < 0,05$) (Figuras 12 e 13).

A imunomarcagem de **STAT3** também ocorreu tanto em membrana quanto em citoplasma, ocorrendo em 100% das amostras do grupo controle negativo (H-score = 20%) e distribuindo-se em todos os estratos epiteliais, assim como nos grupos experimentais dos dois períodos avaliados. Após 8 semanas, a expressão de STAT3 apresentou-se reduzida nos grupos 4-NQO (30%; H-score = 6%) e 4-NQO+Veículo (5%; H-score = 1%), este último diferindo de forma significativa dos grupos controle negativo e 4-NQO ($p < 0,05$). Em 12 semanas houve redução significativa na expressão de STAT3 no grupo tratado com 4-NQO (5%; H-score = 1%) quando comparado ao controle negativo. O tratamento com 100mg/Kg de peso corporal de curcumin em 8 semanas (H-score = 5%), reduziu em 25% e 83%, respectivamente, a expressão do anticorpo, que diferiu estatisticamente dos grupos controle negativo (H-score = 20%) e 4-NQO (H-score = 6%) ($p < 0,05$). Após 12 semanas, a expressão de STAT3 em ambos os grupos tratados com curcumin, 30 e 100 mg/Kg de peso corporal, foi reduzida comparada ao grupo controle negativo, porém não demonstrando diferença significativa ($p > 0,05$); e por outro lado, foi observado aumento de STAT3 em ambos os grupos tratados com curcumin, 30 (H-score = 56%) e 100 mg/Kg de peso corporal (H-score = 4%), apresentando diferença significativa em relação ao grupo 4-NQO (H-score = 1%) ($p < 0,05$) (Figuras 14 e 15).

Figura 6 – Fotomicrografias evidenciando a marcação da proliferação celular pelo anticorpo PCNA em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 8 semanas à carcinogênese por 4-NQO. Grupo Controle negativo – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/Kg). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo)

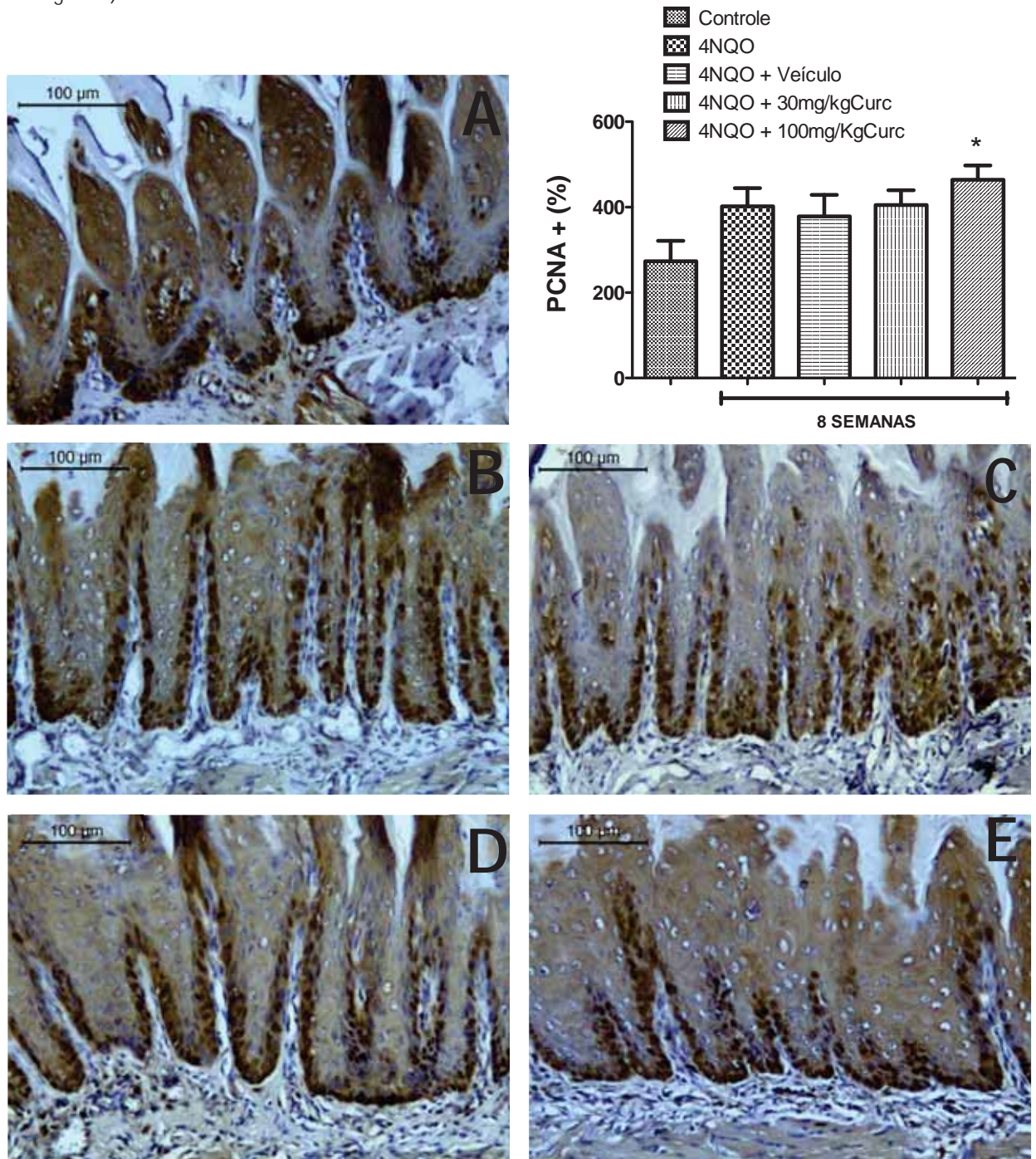


Figura 7 – Fotomicrografias evidenciando a marcação da proliferação celular pelo PCNA em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 12 semanas à carcinogênese por 4-NQO. Grupo Controle – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (+ $p < 0,05$ em relação ao grupo 30mg/KgCurc)

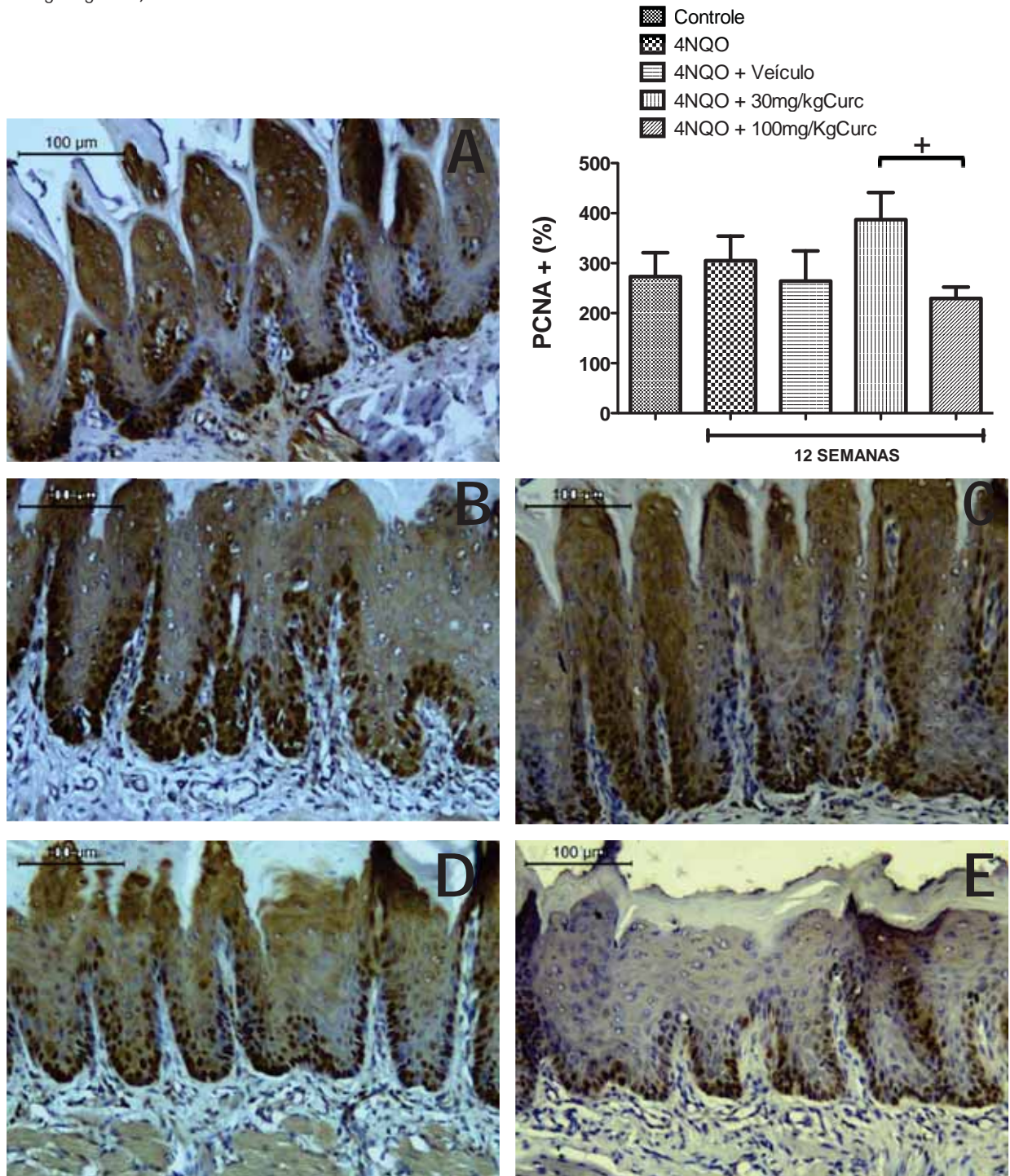


Figura 8 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo Bcl-2 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 8 semanas à carcinogênese por 4-NQO . Grupo Controle – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo)

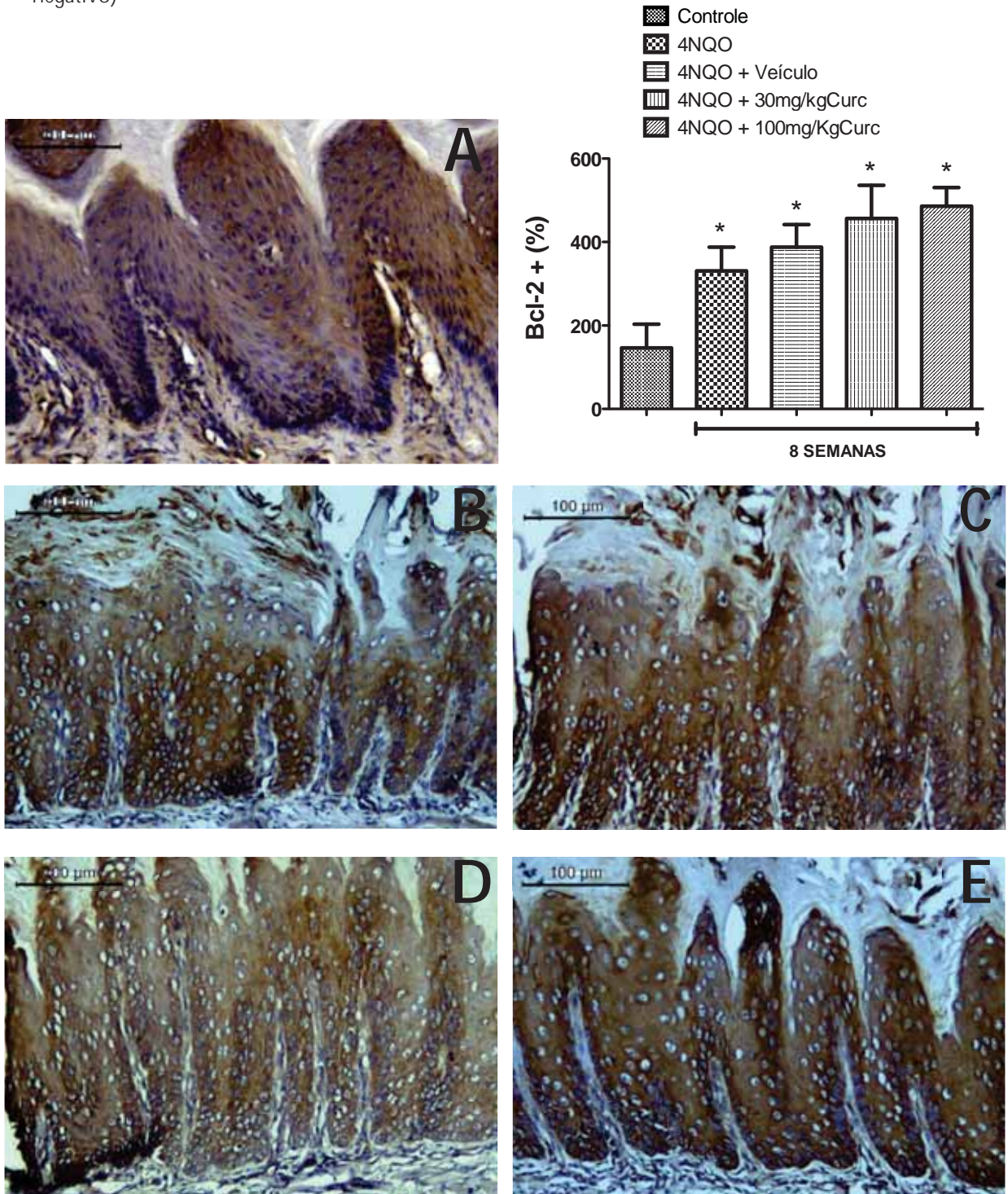


Figura 9 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo Bcl-2 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 12 semanas à carcinogênese por 4-NQO. Grupo Controle negativo – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/Kg de curcumin) e Figura E (4-NQO + 100 mg/Kg de curcumin). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 100mg/KgCurc)

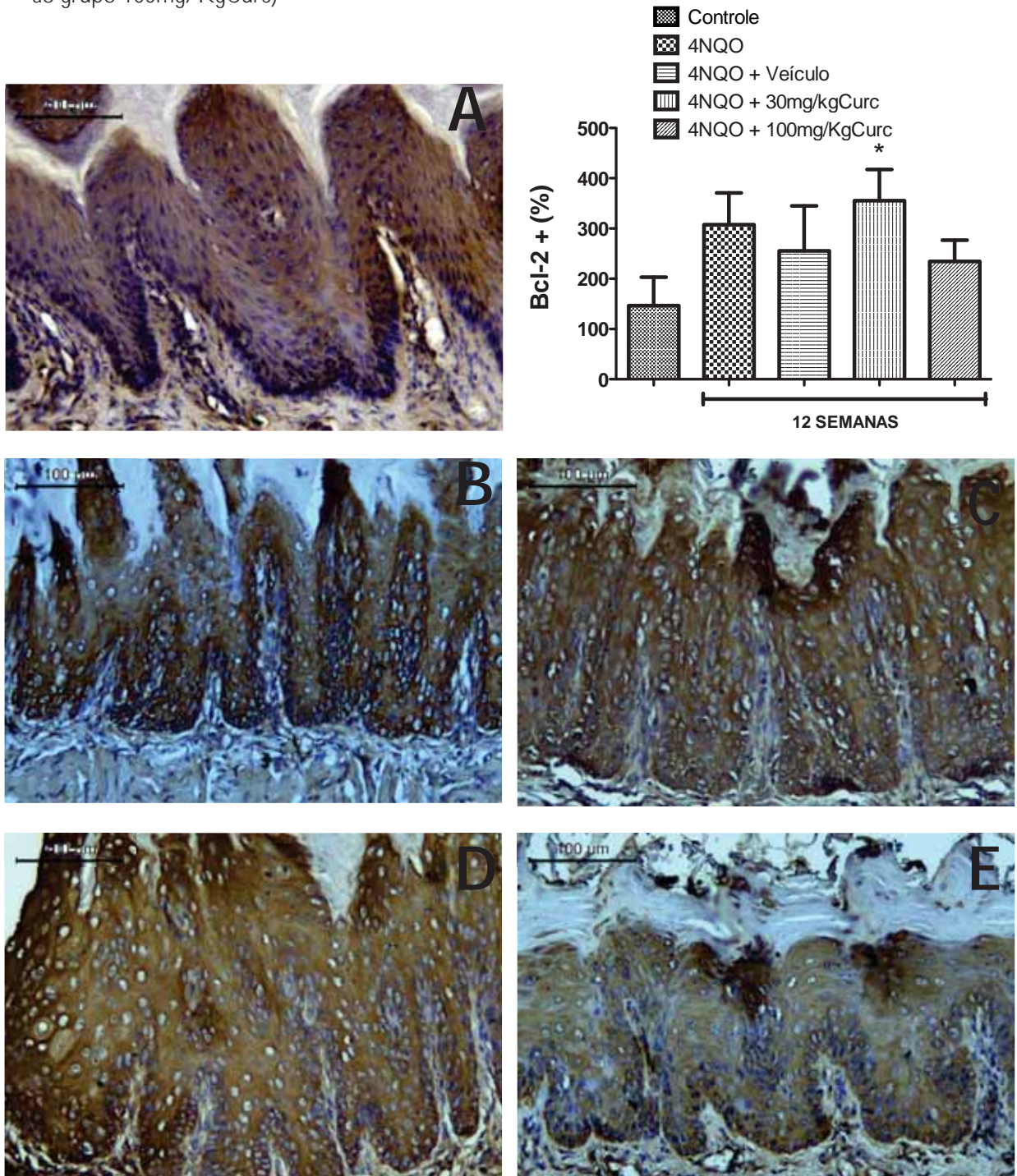


Figura 10 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS1 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 8 semanas à carcinogênese por 4-NQO . Grupo Controle negativo – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo)

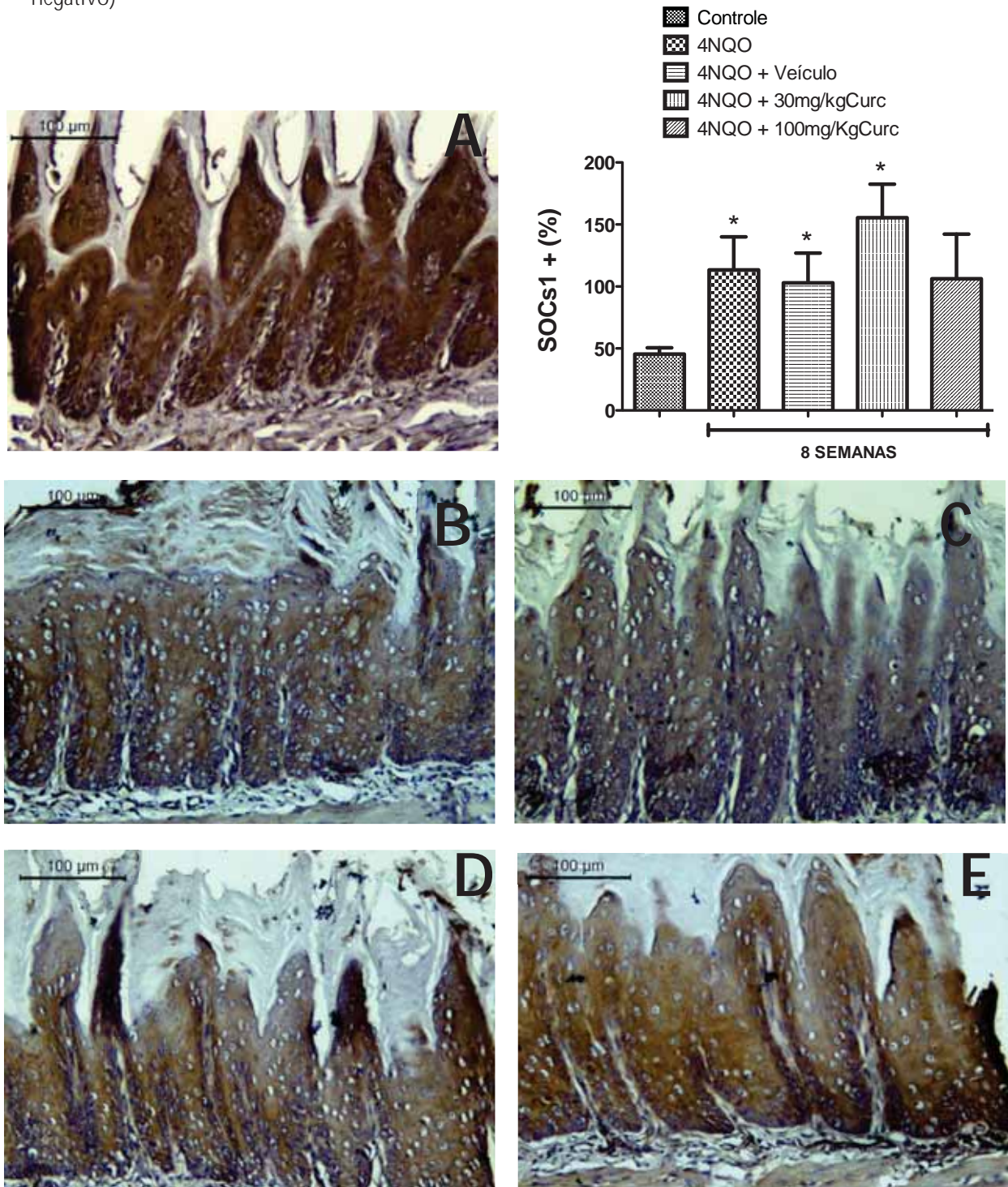


Figura 11 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS1 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 12 semanas à carcinogênese por 4-NQO. Grupo Controle negativo – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo)

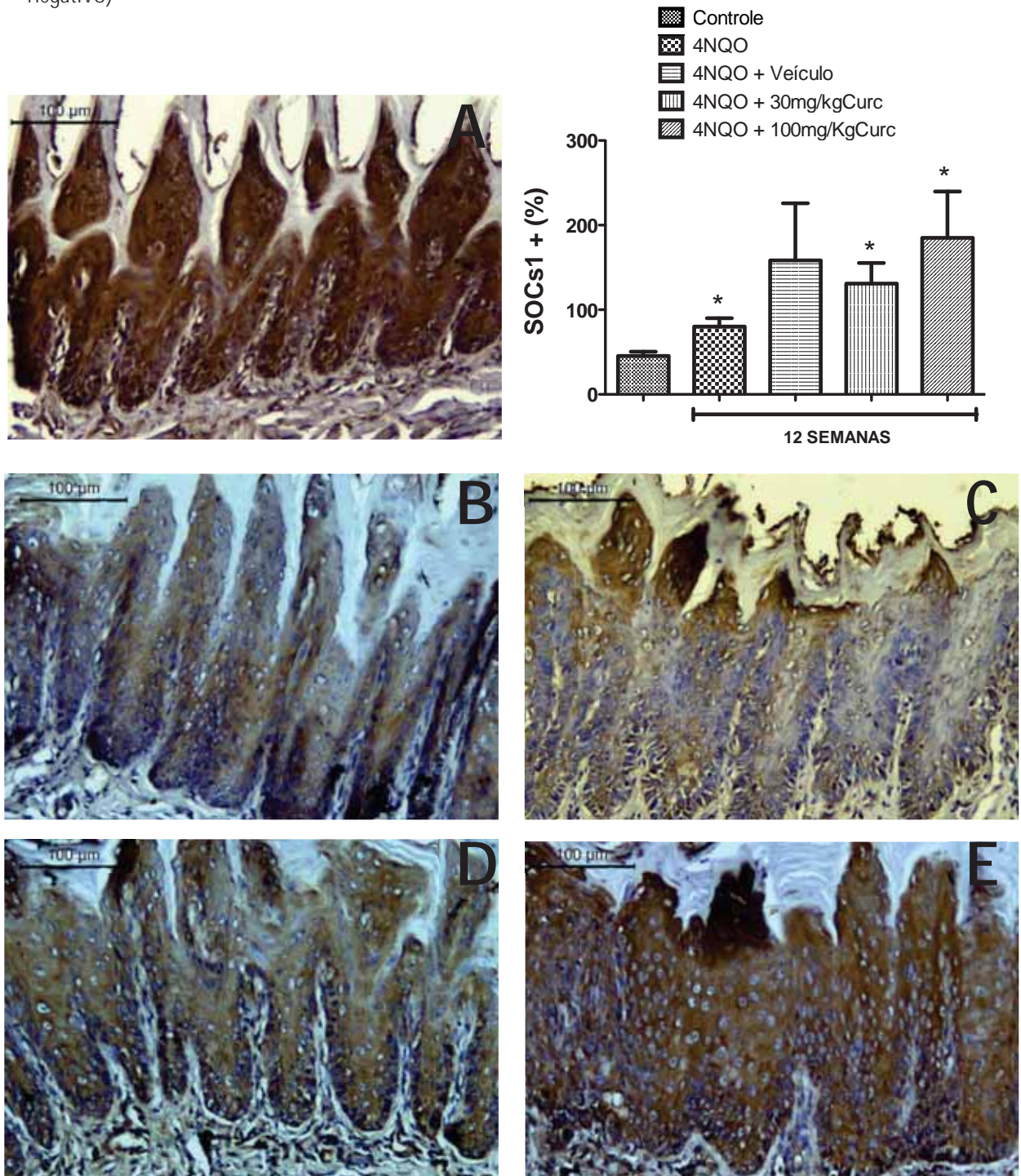


Figura 12 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS3 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 8 semanas à carcinogênese por 4-NQO . Grupo Controle negativo– Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo)

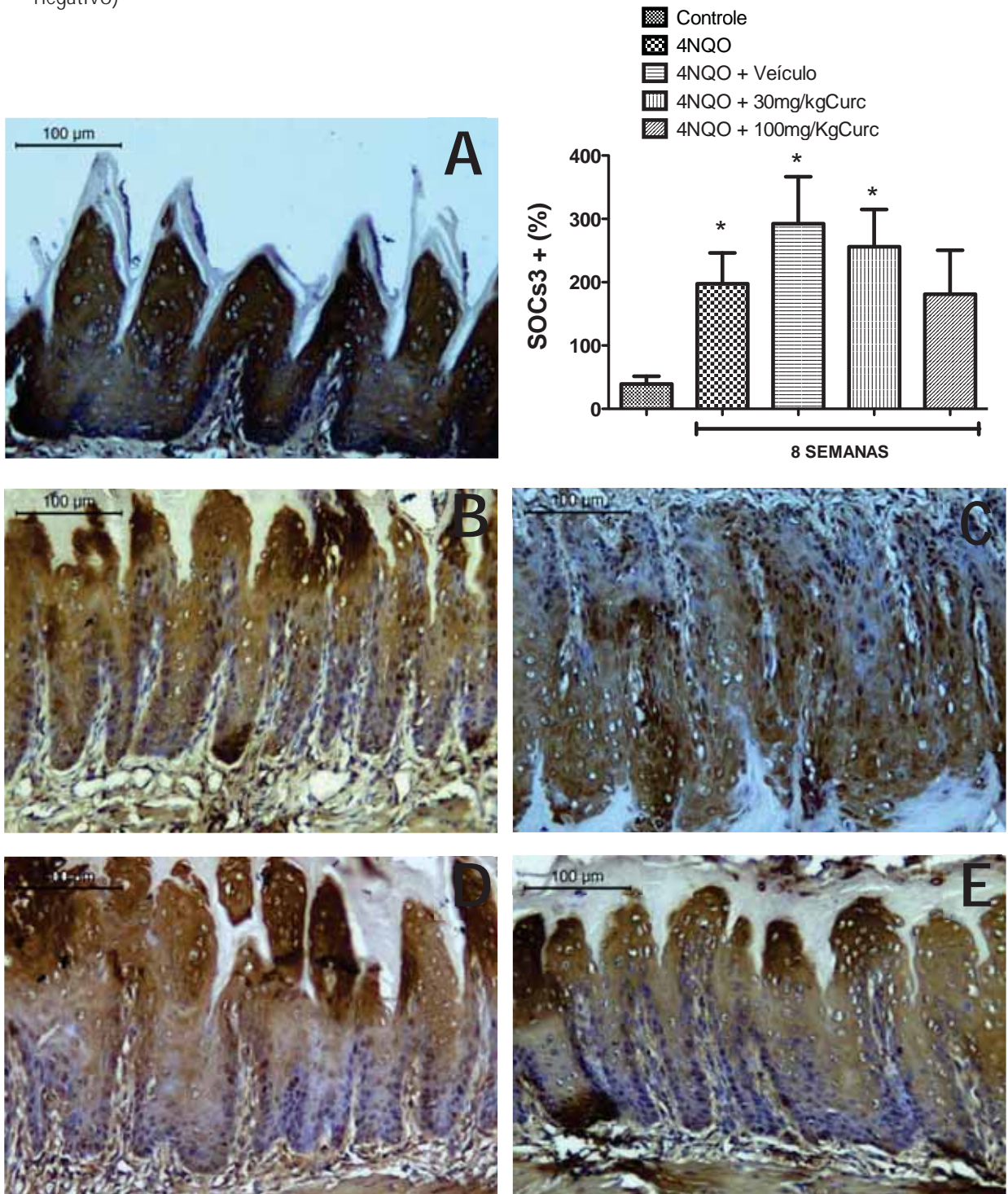


Figura 13 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS3 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 12 semanas à carcinogênese por 4-NQO . Grupo Controle – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo; # $p < 0,05$ em relação ao grupo 4-NQO+Veículo; + $p < 0,05$ em relação ao grupo 30mg/KgCurc)

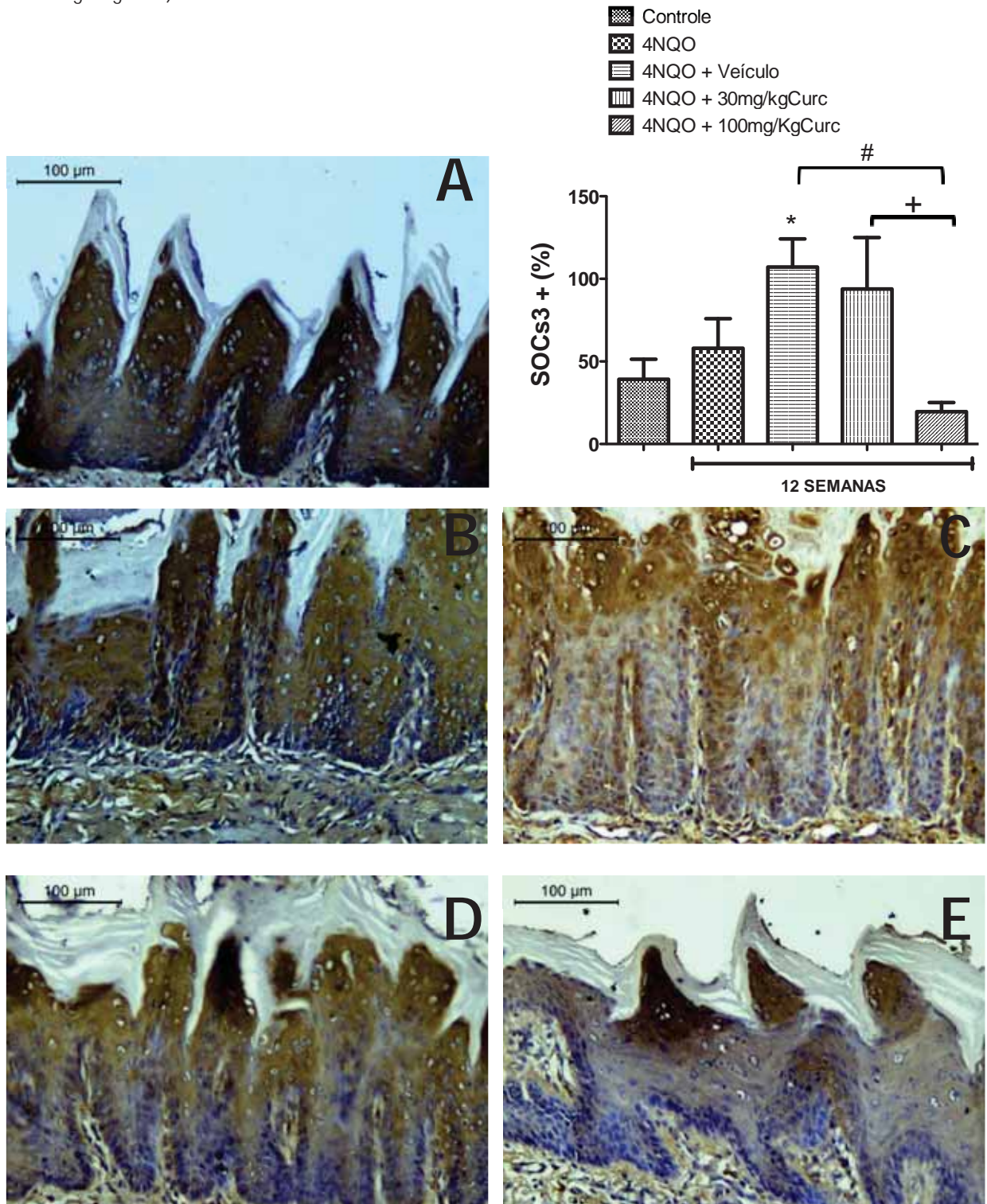


Figura 14 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo STAT3 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 8 semanas à carcinogênese por 4-NQO . Grupo Controle negativo – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo; + $p < 0,05$ em relação ao grupo 4-NQO+ Veículo, # em relação ao grupo 100mg/Kg corporal de curcumin)

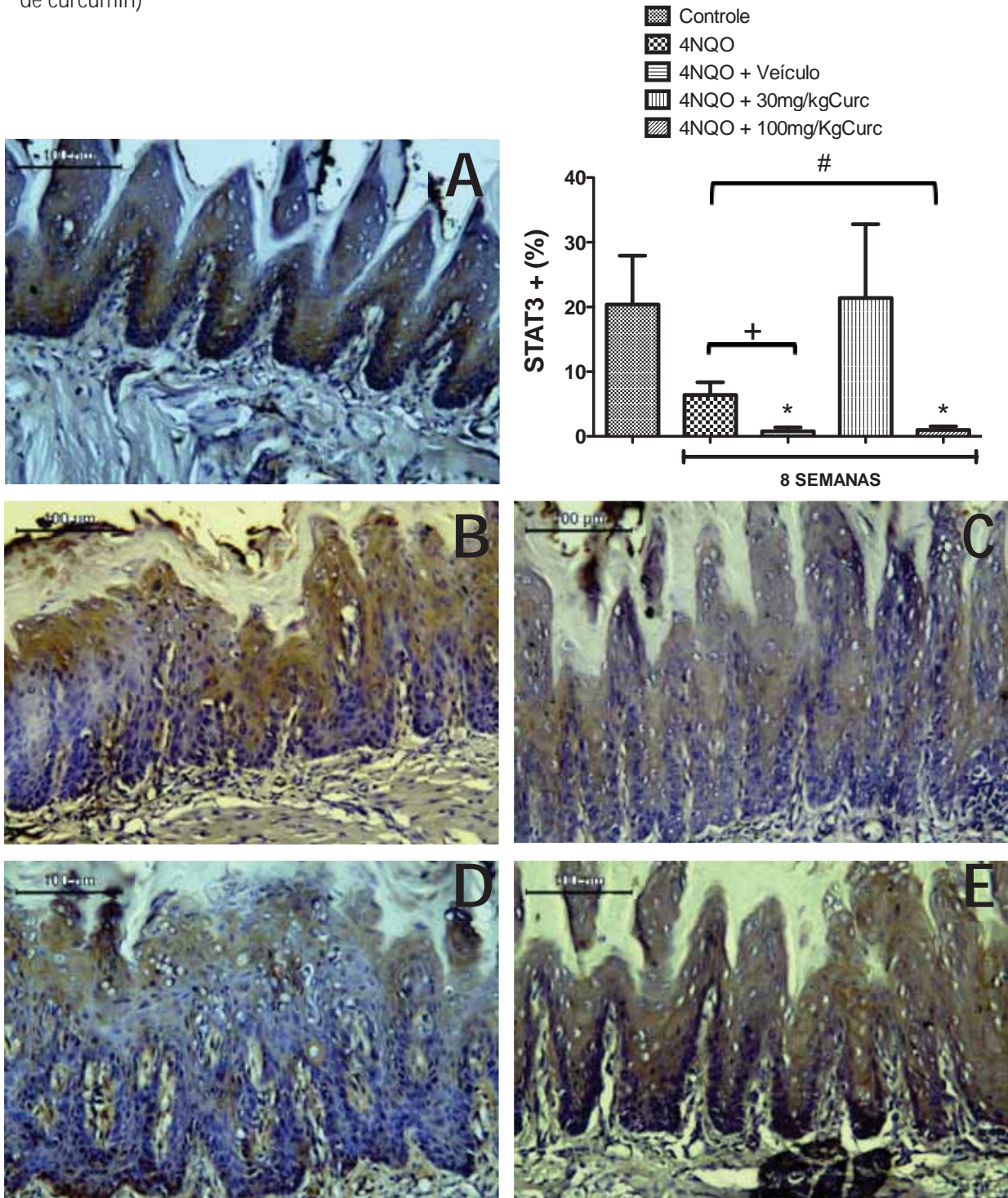
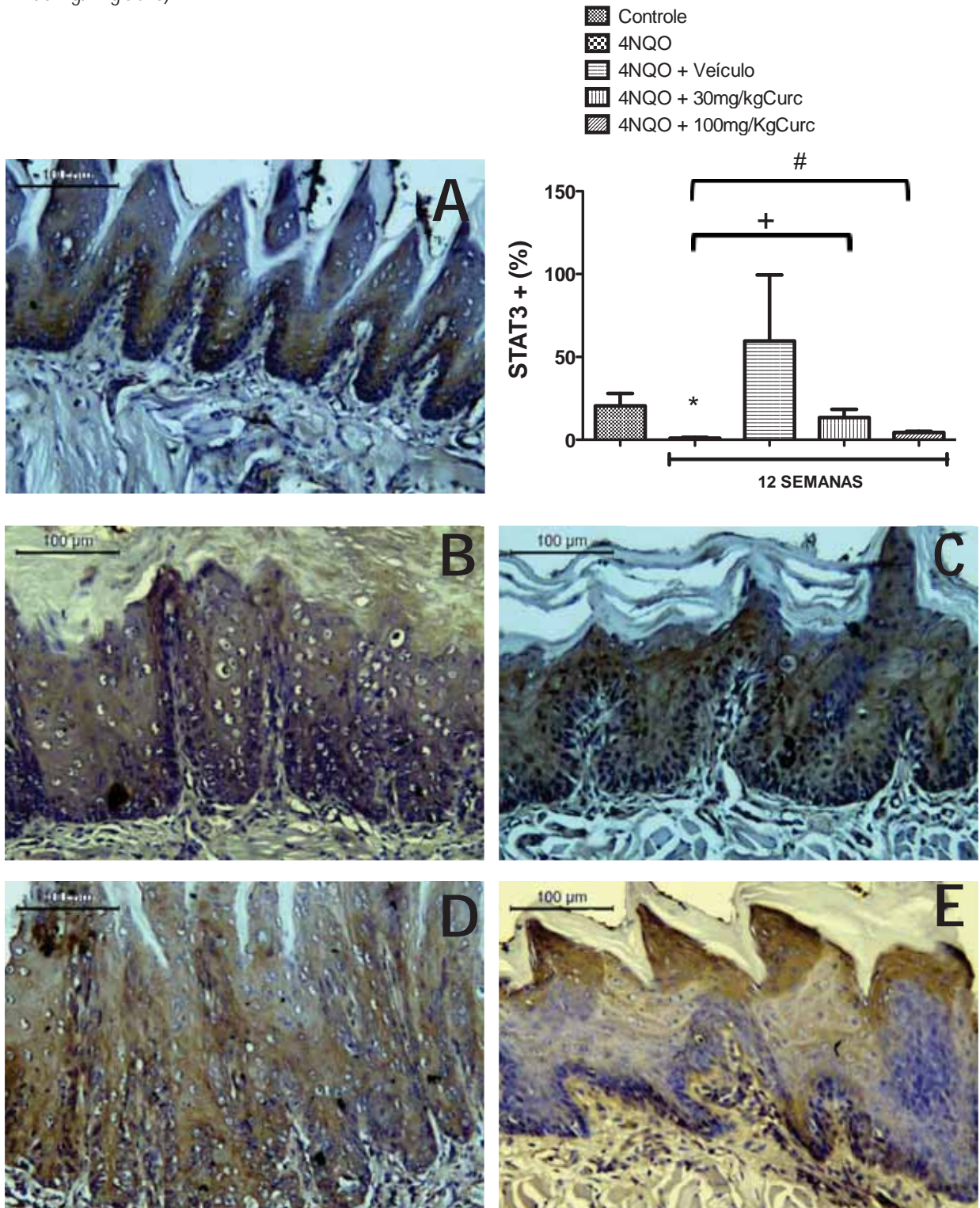


Figura 15 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo STAT3 em região posterior da língua, referente aos animais submetidos ao período de 12 semanas à carcinogênese por 4-NQO. Grupo Controle – Figura A; Grupos experimentais – Figura B (4-NQO), Figura C (4-NQO + Veículo), Figura D (4-NQO + 30mg/KgCurc) e Figura E (4-NQO + 100 mg/KgCurc). Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo; + $p < 0,05$ em relação ao grupo grupo 30mg/KgCurc, # $p < 0,05$ em relação ao grupo 100mg/KgCurc)



5.5 PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada apenas para as amostras de 12 semanas, e os dados obtidos da análise de RT-qPCR foram avaliados utilizando teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos de cada gene analisado.

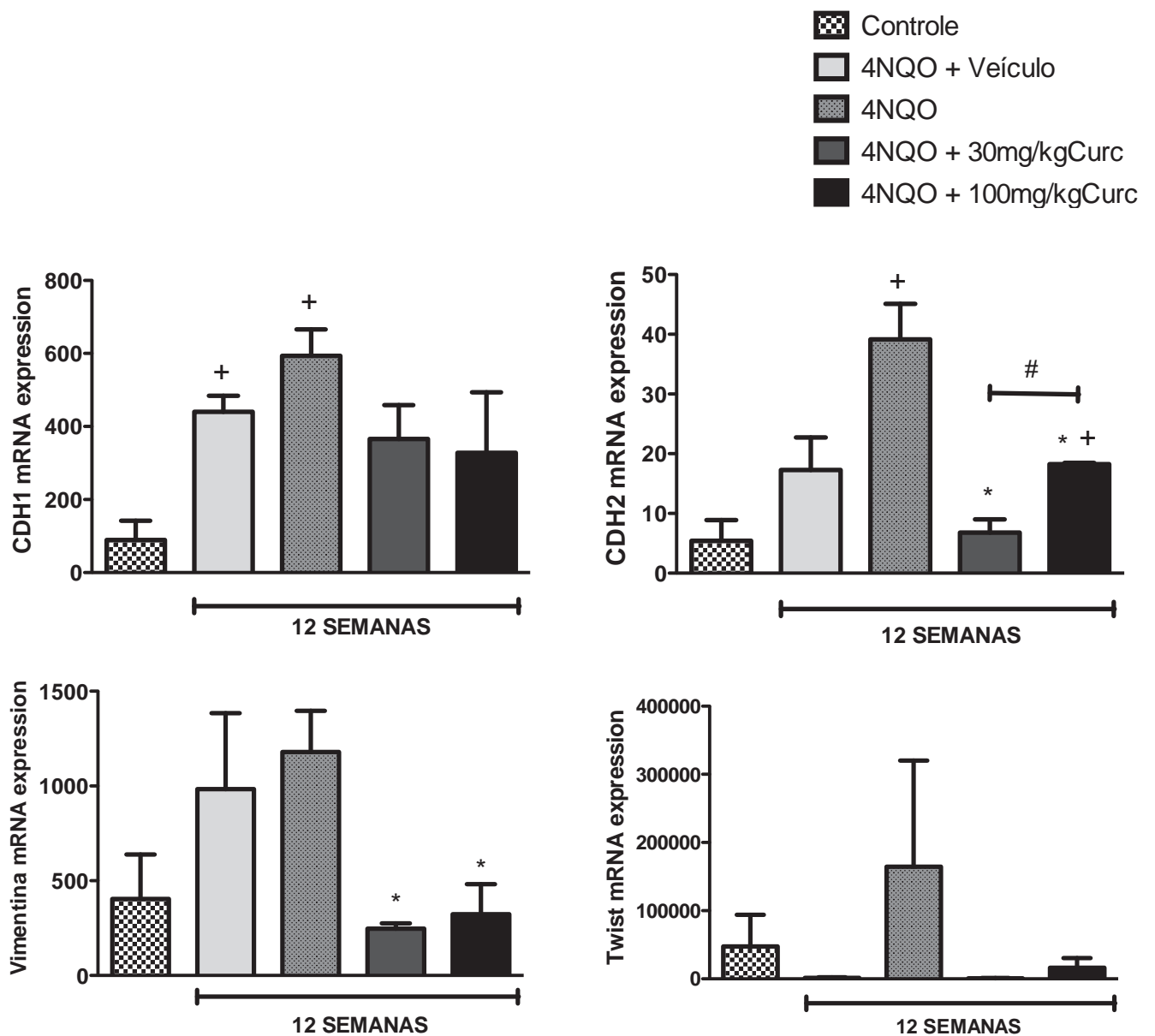
Observou-se que a expressão do gene *Cdh2* foi aumentada após o tratamento com 4-NQO+Veículo e 4-NQO, diferindo este último de forma significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento com ambas as doses de curcumin reduziu de forma significativa a expressão de *Cdh2* comparado ao grupo 4-NQO ($p < 0,05$); entretanto, mesmo no tratamento com a maior dose de curcumin, a expressão do gene manteve-se aumentada em relação aos grupos 30mg/Kg de peso corporal de curcumin e controle negativo ($p < 0,05$).

A expressão de *Cdh1* apresentou-se elevada após o tratamento com 4-NQO e 4-NQO+Veículo em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento com ambas as doses de curcumin demonstrou tendência em reduzir a expressão de *Cdh1* ($p > 0,05$).

Observou-se que a expressão de *Vimentina* foi aumentada com os tratamentos de 4-NQO e 4-NQO+Veículo em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). Após o tratamento com 30 e 100mg/Kg de peso de curcumin a expressão de vimentina foi reduzida de forma significativa comparada ao grupo 4-NQO ($p < 0,05$).

A expressão do gene *TWIST1* foi elevada após o tratamento com 4-NQO em relação ao controle negativo, porém não de forma significativa ($p > 0,05$). E o tratamento com ambas as doses de curcumin demonstrou tendência na redução da expressão de *TWIST1* comparado ao grupo 4-NQO ($p > 0,05$) (Figura 16).

Figura 16 - Gráficos representativos da expressão gênica, por RT-qPCR, para as amostras referentes ao período experimental de 12 semanas. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (+ $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo; * $p < 0,05$ em relação ao grupo 4-NQO; # $p < 0,05$ entre os grupos 30 e 100mg/KgCurc)





DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Curcumin possui excelente tolerância e parece não induzir efeitos secundários e não desejáveis quando administrado experimentalmente em animais (Guimarães et al.³⁰, 2011; Gulcubuk et al.³³, 2006; Fu et al.²⁵, 2008). Ainda que experimentalmente utilizado, os resultados de vários estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* apontam que o curcumin apresenta potencial terapêutico no tratamento e prevenção de várias doenças crônicas incluindo o câncer (Fu et al.²⁵, 2008; Guimarães et al.³⁰, 2011; Gulcubuk et al.³³, 2006; Lin et al.⁴⁷, 2010; Manoharan et al.⁵¹, 2009; Teiten et al.⁸⁵, 2010; Zong et al.¹⁰¹, 2012). As doses de 30 e 100mg/Kg de peso corporal de curcumin empregadas no presente trabalho foram baseadas no trabalho de Guimarães et al.³⁰ (2011), que mostraram que essas dosagens administradas intragastricamente foram bem toleradas pelos animais e não apresentaram efeitos sistêmicos ou locais indesejáveis. Os períodos experimentais de 8 e 12 semanas representam os períodos iniciais do processo carcinogênico induzido pelo 4-NQO (Tanaka et al.⁸³, 1994; Noguti et al.⁵⁹, 2012). Portanto, para avaliar os efeitos do curcumin nas fases iniciais do processo de carcinogênese, o fitoterápico foi administrado concomitante aos períodos experimentais citados anteriormente.

Os efeitos do curcumin sobre os eventos iniciais da carcinogênese foram avaliados através da expressão gênica, imunomarcacão utilizando-se imunohistoquímica e análise morfológica das modificações teciduais. O 4-NQO induziu modificações no epitélio do dorso da língua desde o período de 8 semanas, acentuando-se no período de 12 semanas. Nos grupos em que o fitoterápico foi empregado foi observada diminuição das alterações arquiteturais do epitélio, quando comparado aos grupos tratados com 4-NQO, destacando-se o tratamento com 100mg/kg de peso corporal por 12 semanas. Essas observações vão ao encontro com os resultados obtidos por Tanaka et al.⁸³ (1994), que verificaram redução de

lesões pré-malignas em ratos tratados com curcumin quando da utilização do mesmo protocolo experimental do presente trabalho.

No sentido de abordar o diagnóstico laboratorial na fase inicial da carcinogênese e avaliar o impacto do curcumin nesse processo, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para detecção de imunomarcadores que possam apresentar significado prognóstico e terapêutico nessa fase. PCNA, Bcl-2, SOCs1 e -3, e STAT3 foram avaliados, considerando-se o papel de cada um dentro da carcinogênese. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), genes reguladores de apoptose (Bcl-2), genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS), genes transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1 e Cdh2, e TWIST1 são exemplos de proteínas envolvidas na carcinogênese de forma geral, possivelmente atuando na transformação de lesão pré-maligna oral em maligna (Placzek et al.⁶⁷, 2010; Ohara et al.⁶¹, 2013; Wang et al.⁹², 2013).

A imunopositividade para PCNA, antígeno nuclear associado à proliferação que é específico para as células nas fases ativas do ciclo celular (De Biasio et al.²⁰, 2013), foi encontrada apenas nas células da camada basal e parabasal do epitélio normal, enquanto nas displasias a marcação era evidente também nas células das camadas espinhosa e superficial, o que está de acordo com outros estudos (Faria et al.²³, 2006; Silva et al.,⁷⁸ 2007). Verificou-se ainda, que qualitativamente após 12 semanas de tratamento com 4-NQO a imunomarcação era mais exuberante. Essa observação foi confirmada pelos maiores valores obtidos pelo H-score. Tais resultados estão de acordo com outros trabalhos que utilizam o 4-NQO para indução de carcinoma espinocelular (CEC) em ratos (Kaplan et al.⁴⁰, 2002; Silva et al.⁷⁸, 2007; Moon et al.⁵⁵, 2012). Observou-se que a expressão de Bcl-2 também foi elevada após o tratamento com 4-NQO após 8 e 12 semanas, como verificado por Nishimura⁵⁸ (1999), que também utilizou da mesma metodologia do presente trabalho estudando a carcinogênese. Verificou-se que após 8 semanas, independente da dose utilizada, o tratamento com curcumin não

promoveu redução da imunomarcção de PCNA e Bcl-2, enquanto que após 12 semanas, a imunopositividade dos anticorpos foi acentuadamente reduzida pela administração da maior dose do fitoterápico, confirmando a propriedade do curcumin em deprimir a expressão de PCNA e Bcl-2, como demonstrado por Dahmke et al.¹⁹ (2013). A diminuição de Bcl-2 pelo curcumin é confirmada por Li et al.⁴⁶ (2013). Para esses dois anticorpos, pode-se sugerir que o curcumin atue de forma dose e tempo-dependente, uma vez que seu efeito foi diretamente proporcional à maior dose de administração, esta adquirindo efeitos significativos em relação aos outros grupos experimentais apenas após 12 semanas.

A positividade dos demais anticorpos analisados, com exceção do STAT3, também foi aumentada em ambos os períodos experimentais, após o tratamento com 4-NQO. No presente trabalho, a imunomarcção de SOCS1 manteve-se aumentada após 12 semanas de tratamento com 4-NQO. Esses resultados estão parecidos com os achados de Raccurt et al.⁶⁹ (2003). Pode-se interpretar o aumento dessa positividade com a resistência na transformação de uma célula normal em neoplásica, como citado por Cooper et al.¹⁷ (2010). Contrário aos resultados para SOCS1, a imunopositividade para SOCS3 foi reduzida após 12 semanas de tratamento com 4-NQO quando comparado aos valores obtidos no período de 8 semanas. Embora utilizando protocolos experimentais distintos, os resultados do presente trabalho vão ao encontro com os resultados obtidos por Rossa Jr et al.⁷³ (2012) que avaliaram a imunomarcção de SOCS3 em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e observaram significativa redução da proteína nos estágios iniciais da carcinogênese. Confirmando esses achados Ohara et al.⁶¹ (2013) analisaram a imunomarcção de SOCS3 em diversos tipos de câncer, confirmando sua participação nos eventos precoces do processo carcinogênico. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura, o que significa que a redução da positividade de SOCS3 e o aumento de SOCS1 são inversamente proporcionais ao tamanho do tumor. Portanto, de forma semelhante à SOCS3, a proteína

SOCS1 pode influenciar a transdução de sinais proliferativos através da regulação STAT atuando na sobrevivência, diferenciação e transformação celular como descrito por Cooper et al.¹⁷, (2010). Esta atividade é reforçada ao observar-se a expressão de STAT3, que no presente trabalho foi reduzida mesmo após o tratamento com 4-NQO, possivelmente associada à modulação de SOCS, especificamente SOCS3, estando sua ativação relacionada à excessiva expressão de unidades oncogênicas que conduzem à proliferação e metástases como demonstra Wang et al.⁹², (2013), sendo sua expressão diretamente proporcional ao desenvolvimento do tumor. Ainda, nesse contexto, verificou-se que o tratamento com a maior dose de curcumin atuou reduzindo a imunomarcagem de SOCS3 e STAT3, desde o período de 8 semanas, acentuando-se após 12 semanas de tratamento com o fitoterápico. A propriedade do curcumin em reduzir STAT3 é citada por Weissenberger et al.⁹³, (2010), que avaliaram a atuação do fitoterápico em células cancerosas. Entretanto, é importante salientar que mesmo apresentando-se reduzida, a expressão de STAT3 foi aumentada no grupo tratado com 100mg/Kg de peso corporal de curcumin comparado ao grupo 4-NQO; fato este possivelmente ocorrendo devido à alta expressão de SOCS3 neste último grupo, que como demonstrado na literatura atua como regulador negativo da expressão de STAT3 (Ogata et al.⁶⁰, 2006; Rossa Jr et al.⁷³, 2012) promovendo a remissão do mesmo, quando expresso de forma elevada. Frente a essa evidência, torna-se importante salientar que a acentuada redução de SOCS3 por curcumin pode não representar um mecanismo favorável na supressão da progressão dos estágios da carcinogênese. Contrariamente, SOCS1 foi expressivamente aumentado pelo curcumin em ambas as doses, principalmente após o tratamento com a maior dose do fitoterápico por 12 semanas, resultado esse também descrito por Chen et al.¹⁵ (2013). Esse efeito é citado por Guimarães et al.³² (2013), que em seu estudo também verificaram o aumento in vitro de SOCS1 em células tratadas com curcumin, sugerindo ser um mecanismo

adicional envolvido na modulação da ativação de NF- κ B, podendo estar relacionada com os efeitos anti-inflamatórios do fitoterápico.

Esses resultados confirmam a propriedade do curcumin em atuar regulando as proteínas envolvidas ao processo carcinogênico, como demonstrado por trabalhos dispostos na literatura (Aggarwal et al.⁴, 2004; Chen et al.¹⁶, 1999; Guimarães et al.³², 2013). Pelo menos no presente trabalho, os resultados da imunomarcação demonstraram que esse efeito do fitoterápico ocorreu de forma dose e tempo-dependente, pois tanto o aumento da expressão de SOCS1 quanto a redução das demais proteínas foram promovidos sempre pela maior dose de curcumin, de forma mais expressiva no período de 12 semanas.

A atividade anti-neoplásica do curcumin é reforçada quando observado o perfil de expressão de RNAm dos genes avaliados, que também foi modificado pelo fitoterápico, havendo redução da intensidade de expressão principalmente de vimentina, que foi reduzida por ambas as doses de curcumin quando comparada ao grupo 4-NQO. Sua expressão foi semelhante, não diferindo estatisticamente, ao grupo controle; o que demonstra a capacidade do curcumin como regulador negativo da atividade desse gene, atividade esta também descrita por Sun et al.⁸⁰ (2013) que verificaram redução da expressão de vimentina em linhagens de células derivadas de câncer, após o tratamento com curcumin. Portanto, a diminuição de vimentina favorece a atenuação do processo carcinogênico, uma vez que quando associada às células epiteliais, indica a transição destas para células mesenquimais, sugerindo possível quadro de invasão celular e metástase (Liu et al.⁴⁸, 2010; Nijkamp et al.⁵⁷, 2011). De forma semelhante, outro gene relacionado ao processo de transição celular epitelial para mesenquimal é o Cdh2, que também está relacionado à fenótipos malignos, estando altamente expresso em carcinoma oral de células escamosas (Domenico et al.²¹, 2011). Diferentemente, a redução da expressão de Cdh1 favorece o processo de transição da célula epitelial em mesenquimal, por proporcionar a perda de adesão entre as células, promovendo a progressão

do processo carcinogênico. Ainda, implicado à progressão da carcinogênese encontra-se o TWIST1, gene envolvido em processos tardios; desempenhando papel importante na progressão de carcinoma oral de células escamosas (Ou et al.⁶², 2008), e atuando como preditor de metástases distantes (Xie et al.⁹⁴, 2009).

No presente trabalho, observou-se que a expressão de Cdh2 foi reduzida por ambas as doses do fitoterápico, diferindo estatisticamente do grupo 4-NQO e semelhante ao grupo controle, demonstrando a efetiva atuação do curcumin na supressão desse gene. Por outro lado, o curcumin demonstrou uma tendência sobre a redução de Cdh1, que apresentou-se menor comparado ao grupo tratado com 4-NQO. Porém, verificou-se que a expressão de Cdh1 manteve-se aumentada, mesmo após o tratamento com o fitoterápico, estando de acordo com os resultados de Sun et al.⁸⁰ (2013) e Chang et al.¹⁴ (2013), que observaram elevada expressão do gene após a administração de curcumin em linhagens de células cancerosas. Esses dados representam aspecto positivo, considerando-se que o aumento de Cdh1 promove a manutenção da adesão celular e compromete o processo de transição da célula epitelial em mesenquimal. Ainda, observou-se que o gene TWIST1 apesar de pouco expresso, houve tendência em ser aumentado pela maior dose de curcumin, contrariamente ao verificado por Weissenberger et al.⁹³ (2010) que descreveram redução do gene, após a administração de curcumin.

Portanto, considerando-se a participação de cada um desses genes no curso da carcinogênese, o curcumin sinaliza de forma positiva na reversão dos eventos necessários à progressão do processo carcinogênico.

De modo geral, os resultados demonstraram que o curcumin atua modulando a expressão de genes e proteínas implicados na carcinogênese, desde o seu período mais precoce e principalmente num período mais tardio, reduzindo dessa forma, as alterações a nível tecidual. Como verificado, o curcumin foi eficaz em reverter a severidade e intensidade

de ocorrência das displasias e atipias celulares, demonstrando sua capacidade em prevenir, por exemplo, a progressão de uma lesão com características histológicas potencialmente malignas à um câncer.

Contudo, são necessárias maiores investigações sobre a atuação do curcumin nas diferentes vias moleculares responsáveis pela expressão das proteínas e genes envolvidos na carcinogênese, uma vez que o curcumin possui diversas propriedades como, por exemplo, a atividade anti-inflamatória; e esta conseqüentemente pode promover eventos que também atuem na progressão do processo de carcinogênese.



CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a efetiva propriedade do curcumin em modular a expressão dos genes e proteínas indispensáveis à carcinogênese.

Portanto, o curcumin foi capaz de amenizar a ocorrência dos eventos moleculares implicados nos períodos iniciais da carcinogênese e sua progressão, revertendo a intensidade das modificações teciduais características de um processo maligno ou potencialmente maligno. Dessa forma, o curcumin acaba por intervir e atenuar o desenvolvimento do processo carcinogênico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003; 23(1): 363-98.
2. Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK, et al. *Turmeric: the genus curcuma.* New York: CRC Press; 2007.
3. Aggarwal BB, Wei Yuan, Shiyong Li, Subash C. Gupta. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57(9): 1529–42.
4. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer.* 2004; 111(5): 679-92.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 5th ed. New York : Garland Science/Taylor & Francis Group; 2008.
6. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* 2008; 267(1): 133–64.
- M
7. Belakavadi M, Salimath BP. Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF-kB and caspase activated DNase. *Mol Cell Biochem.* 2005; 273(1–2): 57–67.
8. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* 1985; 41(3): 899-906.
9. Bisht S, Mizuma M, Feldmann G, Ottenhof NA, Hong SM, Pramanik D, et al. Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (NanoCurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(8): 2255–64.
10. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(1): S19.e1-S19.e12.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

11. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(4): 945–54.
12. Cao A, Li Q, Yin P, Dong Y, Shi H, Wang L, et al. Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29 cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis.* 2013; 18(11): 1391-402.
13. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene.* 2002; 287(1-2): 11-22.
14. Chang YH, Jiang M, Liu KG, Li XQ. Curcumin inhibited hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition in hepatic carcinoma cell line HepG2 in vitro. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2013; 33(8): 1102-6.
15. Chen CC, Sureshbabul M, Chen HW, Lin YS, Lee JY, Hong QS, et al. Curcumin suppresses metastasis via Sp-1, FAK inhibition, and E-Cadherin upregulation in colorectal cancer. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 541695. doi: 10.1155/2013/541695
16. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1999. 19(5): 3675–80.
17. Cooper JC, Shi M, Chueh FY, Venkitachalam S, Yu CL. Enforced SOCS1 and SOCS3 expression attenuates Lck mediated cellular transformation. *Int J Oncol.* 2010; 36(5): 1201-8.
18. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science.* 1997; 277(5332): 1630–5.
19. Dahmke IN, Backes C, Rudzitis-Auth J, Laschke MW, Leidinger P, Menger MD. Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered. *PLoS One.* 2013; 8(12): e81122. doi:10.1371/journal.pone.0081122.
20. De Biasio A, Blanco FJ. Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer?. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2013; 91: 1-36.

21. Domenico DI M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, DE Rosa A, et al. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2011; 31(12): 4211-8.
22. Elattar TM, Virji AS. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 2000; 20(3): 1733-8.
23. Faria PR. Carcinogênese bucal induzida pelo 4-NQO em língua de camundongos Knockout para o gene da galectina-3 [tese de doutorado]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2006.
24. Feng Z, Gan H, Cai Z, Li N, Yang Z, Lu G et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1a, TWIST and E-cadherin is associated with aggressive tumor phenotypes in endometrioid endometrial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2013; 43(4): 396–403.
25. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol.* 2008; 73(2): 399–409.
26. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012; 8(11): 1407–25.
27. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as Curecumin: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2007; 75(4): 787-809.
28. Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB. Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it? *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(9): 1010–30.
29. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, et al. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest.* 1998; 102(7): 1385-92.
30. Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res.* 2011; 46(2): 269-79.
31. Guimarães MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.* 2012; 18(1): 155-63.

32. Guimarães MR, Leite FR, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr . Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1309-17.
33. Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, et al. Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2006; 53(1): 49–54.
34. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2012; 15(1): 195-218.
35. Henriques ACG, Cazal C, Lins RC, de Castro JFL. Análise morfológica da mucosa oral de ratos submetida à carcinogênese pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). *Pesq Bras Odontoped Clín Integr.* 2011; 11(1): 13-20.
36. Isomoto H. Epigenetic alterations in cholangiocarcinoma- sustained IL-6/STAT3 signaling in cholangio- carcinoma due to SOCS3 epigenetic silencing. *Digestion.* 2009; 79(1): 2–8.
37. Javvadi P, Segan AT, Tuttle SW, Koumenis C. The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol.* 2008; 73(5): 1491–1501.
38. Kamat AM, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(3): 1022-30.
39. Kanojia D, Vaidya MM. 4 – Nitroquinoline – 1- oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006; 42(7): 655-67.
40. Kaplan I, Hochstadt T, Dayan D. PCNA en lesiones displásicas de la mucosa de la lengua y del paladar inducidas por aplicación tópica de 4NQO en ratas desalivadas. *Med Oral.* 2002; 7(5): 336-43.
41. Kim SR, Park HJ, Bae YH, Ahn SC, Wee HJ, Yun I et al. Curcumin down-regulates visfatin expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Endocrinology.* 2012; 153(2): 554–63.

42. Komatsu K, Wharton W, Hang H, Wu C, Singh S. PCNA interacts with hHus1/hRad9 in response to DNA damage and replication inhibition. *Oncogene*. 2000; 19(46): 5291–7.
43. Kumar, Abbas V, Aster AK, Jon C. Robbins, *patologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
44. Kuttan, R, Bhanumathy, P, Nirmala, K, George, MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett*. 1985; 29(2): 197–202.
45. Li N, Chen X, Liao J, Yang G, Wang S, Josephson Y, et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis*. 2002; 23(8): 1307–13.
46. Li Y, Zhang S, Geng JX, Hu XY. Curcumin inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation through regulation of Bcl-2/Bax and cytochrome C. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(8): 4599-602.
47. Lin YC, Chen HW, Kuo YC, Chang YF, Lee YJ, Hwang JJ. Therapeutic efficacy evaluation of curcumin on human oral squamous cell carcinoma xenograft using multimodalities of molecular imaging. *Am J Chin Med*. 2010; 38(2): 343-58.
48. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010; 23(2): 213–24.
49. Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 15): 3051–60.
50. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with Ecadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer*. 2008; 112(9): 2088–100.
51. Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, Reena AR. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J*. 2009; 50(2): 139-146.
52. Marie PJ, Hay E. Cadherins and Wnt signalling: a functional link controlling bone formation. *Bonekey Rep*. 2013; 2: 330.

53. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* 2007; 13(2): 126–33.
54. Molavi O, Wang P, Zak Z, Gelebart P, Belch A, Lai R. Gene methylation and silencing of SOCS3 in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2013; 161(3): 348–56.
55. Moon SM, Ahn MY, Kwon SM, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH. Homeobox C5 expression is associated with the progression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41(6): 470 – 6.
56. Nimmannit U, Pongrakhananon V, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Chanvorachote P. Curcumin sensitizes non-small cell lung cancer cell anoikis through reactive oxygen species-mediated Bcl-2 downregulation. *Apoptosis.* 2010; 15(5): 574–85.
57. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen JI, Van der Kogel JA, Kaanders HAMJ, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol.* 2011; 99(3): 344–8.
58. Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res.* 1999; 78(6): 1264–9.
59. Noguti J, Carvalho JG, da Silva VH, Dedivitis RA, Franco M, Ribeiro DA. Alkylation-induced genotoxicity as a predictor of DNA repair deficiency following experimental oral carcinogenesis. *J Mol Histol.* 2012; 43(2): 145-50.
60. Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, et al. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 2006; 131(1): 179–93.
61. Ohara KI, Kondo T, Ito M, Yoshimura A. SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT.* 2013; 2(3): e24053.
62. Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 2008; 28(2): 1355–9.
63. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27(4): 486–94.
64. Papież MA. The influence of curcumin and (-)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. *Drug Chem Toxicol.* 2013; 36(1): 93-101.
65. Pardoll D, Yu H, Jove R. STATs in cancer, inflammation and immunity: a leading role of STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11): 798-809.

66. Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol.* 2001; 77(10): 1007–21.
67. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JD, Pellicchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2010; 1(5): e40.
68. Raccurt M, Tam SP, Lau P, Mertani HC, Lambert A, Garcia-Caballero T. Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89(3): 524 – 32.
69. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* 2009; 11(3): 495-510.
70. Ribeiro DA, Salvadori DM. Gingival changes in wistar rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Eur J Dent.* 2007; 1(3): 152-7.
71. Robert V, Hideaki N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circul Res.* 2003, 92(8): 827–39.
72. Rong Z, Li L, Fei F, Luo L, Qu Y. Combined treatment of glibenclamide and CoCl₂ decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013; 32:32. doi: 10.1186/1756-9966-32-32.
73. Rossa C Jr, Sommer G, Spolidorio LC, Rosenzweig SA, Watson DK, Kirkwood KL. Loss of expression and function of SOCS3 is an early event in HNSCC: altered subcellular localization as a possible mechanism involved in proliferation, migration and invasion. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45197. doi: 10.1371/journal.pone.0045197.
74. Sharma C, Kaur J, Shishodia S, Aggarwal BB, Ralhan R. Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human oral premalignant and cancer cells. *Toxicology.* 2006; 228(1): 1-15.
75. Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer.* 2007; 31(4): 243-305.
76. Smith CJ, Pindborg JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. Copenhagen: C. Hamburger; 1969.
77. Silva BSF, Yamamoto FP, Pontes FSC, Cury SEV, Fonseca FP, Pontes HAR, et al. TWIST and p-Akt immunoeexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17(1): 29-34.

78. Silva RN, Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Placental glutathione Stransferase correlates with cellular proliferation during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Toxicol Pathol.* 2007; 59(1): 61–8.
79. Stleider NE, Reade PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1 oxide. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med.* 1984; 57(5): 524-31.
80. Sun XD, Liu XE, Huang DS. Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway. *Oncol Rep.* 2013; 29(6): 2401-7.
81. Svensson S, Heyden G. Experimental induction of irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. *Int J Oral Surg.* 1982; 11(1):52-8.
82. Swarnakar S, Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Maity P, Sharma AV. Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem.* 2005; 280(10): 9409-15.
83. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, et al. Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of B-Carotene. *Cancer Res.* 1994; 54(17): 4653-9.
84. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(1): 301-13.
85. Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr.* 2010; 5(1): 61-74.
86. Tokita T, Maesawa C, Kimura T, Kotani K, Takahashi K, Akasaka T, et al. Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas. *Int J Oncol.* 2007; 30(3): 689–94.
87. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985; 228(4706): 1440-3.
88. Van Der Waal I, Schepman KP, Van Der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997; 33(5): 291-301.

89. Vareed SK., Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 2008; 17 (6): 1411–7.
90. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol.* 2007; 43(10): 999-1006.
91. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 15(12): 1867–76.
92. Wang Y, Boxel-Dezaire A, Cheon H, Yang J, Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(42): 16975–80.
93. Weissenberger J, Priester M, Bernreuther C, Rakel S, Glatzel M, Seifert V, et al. Dietary curcumin attenuates glioma growth in a syngeneic mouse model by inhibition of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(23): 5781-95.
94. Xie F, Li K, Ouyang X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin Exp Metastasis.* 2009; 26(8): 1025-32.
95. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18(1): 143-64.
96. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology.* 2007; 50(5): 648-58.
97. Zhang J, Li H, Yu JP, Wang SE, Ren XB. Role of SOCS1 in tumor progression and therapeutic application. *Int J Cancer.* 2012; 130(9): 1971-80.
98. Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-Cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines. *PLoS Copenhagen: C. Hamburger;* 1969. *One.* 2013; 8(3): e57692. Doi: 10.1371/journal.pone.0057692.
99. Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol.* 2007; 38(4): 598-606.

100. Zhao H, Ho PC, Lo YH, Espejo A, Bedford MT, Hung MC, et al. Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA damages in breast cancer. *PLoS One*. 2012; 7(1): 2941-6.
101. Zong H, Wang F, Fan QX, Wang LX. Curcumin inhibits metastatic progression of breast cancer cell through suppression of urokinase-type plasminogen activator by NF-kappa B signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(4): 4803-8.
102. Zou P, Helson L, Maitra A, Stern ST, McNeil SE. Polymeric curcumin nanoparticle pharmacokinetics and metabolism in bile duct cannulated rats. *Mol Pharm*. 2013; 10(5): 1977–87.





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 14/2012

Araraquara, 26 de Outubro de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 22/10/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Influência do curcumim na modulação da carcinogênese oral experimental induzida por 4-NQO em ratos" (Proc. CEUA nº 14/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, porém com as seguintes recomendações necessárias: que se efetue um controle diário do estado de saúde dos animais, verificando e registrando os parâmetros informados na resposta do Pesquisador à pendência da CEUA, bem como monitorar o peso dos animais três vezes por semana. As respostas fornecidas pelo Pesquisador devem ser incorporadas no formulário do protocolo inicial, portanto este deve ser refeito e entregue a CEUA, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para AGOSTO/2013.

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao

Prof. Dr. LUÍS CARLOS SPOLIDÓRIO

DD. Pesquisador Responsável

a/c Adriana Cabrera Ortega e Vinícius de Paiva Gonçalves

Departamento de Fisiologia e Patologia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 10 de março de 2014.

VINICIUS DE PAIVA GONÇALVES