

**unesp**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA-UNESP**

**MARIA CLARA BERTOLINI BOTELHO**

**Avaliação do comportamento de ansiedade e alterações morfológicas na amígdala do cérebro de ratos submetidos à carcinogênese bucal quimicamente induzida**

Araçatuba

2018

**MARIA CLARA BERTOLINI BOTELHO**

**Avaliação do comportamento de ansiedade e alterações morfológicas na amígdala do cérebro de ratos submetidos à carcinogênese bucal quimicamente induzida**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé.

Co-orientador: Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Araçatuba

2018

*Dedico este estudo...*

*...à minha família que viveu de forma tão intensa a realização deste sonho ao meu lado.*

## *Agradecimentos*

A *Deus* por tornar tudo isso possível. Agradeço pelas pessoas que colocaste em meu caminho e por todos os momentos e experiências que passei. Obrigada pelas oportunidades e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, *Ricardo* e *Vanessa* por tudo o que me tornei e por serem fundamentais para a realização deste sonho. Obrigada por serem pais extraordinários que não medem esforços para que seus filhos possam andar lado a lado com seus sonhos e por me fazerem acreditar que eu era capaz de alcançar qualquer objetivo, em todos os momentos de minha vida. Agradeço por todo o amor e cuidado e por ensinarem a mim e aos meus irmãos valores demasiadamente importantes para nossas vidas, lições que não se conquistam através de títulos. Vocês são meu maior exemplo e meu amor é do tamanho de minha gratidão por tudo o que fizeram e fazem por mim, infinito!

Agradeço também aos meus irmãos, *Ricardo* e *Maria Tereza* por sempre me transmitirem forças e serem companheiros incríveis, mesmo com a distância que nos separa vocês são meus melhores amigos e me fazem querer ser uma pessoa melhor em todos os dias de minha caminhada. O amor que sinto por vocês é maior do que consigo explicar e esta conquista é por vocês, obrigada por tudo.

Agradeço também a todos os meus familiares que direta ou indiretamente me ajudaram nestes cinco anos. Às minhas avós *Denires* e *Maria Tereza* por toda ajuda que deram a mim e aos meus pais nos momentos de dificuldade durante estes cinco anos e por encurtarem distâncias através de todas as orações destinadas a mim. E aos meus *avôs* que partiram muito cedo, amo-lhes com todo o meu coração.

Ao meu namorado e melhor amigo de laboratório e de vida *José*, que esteve sempre ao meu lado despertando o melhor de mim, estimulando e me dando coragem para seguir tudo o que eu idealizo. Aprendemos muito um com o outro, vivenciamos muitos momentos e criamos memórias especiais. Agradeço pela paciência, pelo apoio, por ser uma pessoa extraordinária e por compartilhar um sentimento tão sincero comigo. Amo muito você!

Aos amigos que eu conhecia antes e aos que me cativaram nestes cinco anos de graduação. Aos meus amigos de ensino médio, *Yara Maria*, *João Virgílio* e *Erika Suzuki* por permanecerem comigo mesmo com a distância e por todo o apoio que me deram. Aos meus amigos pseudo-Araçatubenses, *Fernanda*, *Mayara*, *Paulo*, *Jaqueline* e *Isabela* e *Thais* meu muito obrigada por todo o cuidado, por todos os conselhos e por compartilharem comigo um sentimento muito importante para se conseguir alcançar qualquer sonho, a amizade. Sem os chochorôs compartilhados, sem o medo das piores provas do curso e os cafezinhos depois ao final dos dias cansativos, esta conquista não traria consigo o mesmo significado para mim.

Agradeço a minha co-orientadora de coração e amiga de laboratório, mestre *Jéssica Figueira* por tudo que me ensinou e vivenciou comigo desde a monitoria na Estomatologia até o dia de hoje, com a apresentação deste trabalho. Obrigada por tudo, você é uma pessoa incrível e fonte de inspiração para qualquer aluno que deseja seguir a carreira acadêmica.

À toda a equipe do *Núcleo de Psicossomática* por serem pesquisadores e futuros pesquisadores excelentes e pela ajuda que sempre destinaram a mim quando eu necessitei. Agradeço por me acolherem nesta equipe, eu me orgulho muito e estar ao lado de profissionais como vocês.

Ao *Departamento de Ciências Básicas* e todos amigos que fiz lá, alunos iniciação científica e pós-graduandos, aos docentes e servidores de limpeza e técnico-administrativos. Agradeço ao Departamento por todo acolhimento e por fornecer a infraestrutura e equipamentos necessários para que grande parte dos experimentos deste estudo fossem realizados. Ao *Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica*, por viabilizar seu biotério para os animais utilizados neste estudo e pela infraestrutura oferecida para que algumas etapas experimentais fossem realizadas. Agradeço aos docentes deste departamento e em especial, agradeço a assessora administrativa *Adriana de Paula* e a técnica de laboratório, *Giseli Mitsuy Kayahara* pelo carinho e atenção que proporcionam a todos que adentram no departamento. Agradeço os departamentos como um só, por todo acolhimento e momentos bons que passei realizando meus experimentos em cada um deles.

À *Disciplina de Estomatologia* desta faculdade e os seus docentes *Dr. Éder Ricardo Biasoli*, *Dr. Glauco Issamu Miyahara*, *Dr. Daniel Galera Bernabé*, por me proporcionarem uma aprendizagem ímpar e de me ensinar a enxergar os meus pacientes como um todo e não somente no que diz respeito à minha profissão. Agradeço também a *Disciplina de Anatomia Humana*, representada pelos professores *Dr. José Américo de Oliveira*, *Dr. Paulo Roberto Botacin*, *Dr.ª Roberta Okamoto* e *Dr. Rolf Justino Cruz Rizzolo*, pelo grande aprendizado que me proporcionaram.

Agradeço ao meu orientador, *Professor Dr. Daniel Galera Bernabé*, docente na *Disciplina de Estomatologia* por todos os estímulos e confiança a mim direcionados e principalmente pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionou. Obrigada por me fazer acreditar em minha própria capacidade e estimular em mim, a autoconfiança. Um exemplo de profissionalismo, caráter, conhecimento e comprometimento em tudo o que faz, seja na pesquisa ou na sala de aula. Muito obrigada por sempre ter disponibilizado um pouco do seu tempo para me ajudar e me aconselhar quando precisei. Agradeço por todo o apoio, acolhimento e pela imensidão de conhecimento que você me transmitiu e me transmite a cada dia que passa, espero ter correspondido com as suas expectativas e espero que se um dia me tornar professora, possa exercer minha profissão com a excelência que o senhor exerce a sua.

Ao meu co-orientador, **Professor Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo**, docente na Disciplina de Anatomia Humana, agradeço por compartilhar tantas risadas, conhecimento, músicas boas e principalmente, o amor pela ciência e sua divulgação. Muito obrigada pelos finais de semana disponibilizados para que eu pudesse realizar minha vontade de trabalhar com o cérebro, que se tornou uma das coisas que eu mais amo fazer na minha vida. Sua participação nesta etapa foi demasiadamente importante em todos os quesitos e sou grata por ter tido a oportunidade de aprender tudo o que sei hoje sobre o andamento e cada etapa de processamento do tecido cerebral na pesquisa e por todo conhecimento que o senhor sempre agregou no que para muitos, é só questão de técnica. O senhor, é o exemplo que levo comigo de profissionalismo, caráter e excelência em pesquisa com Neurociência. Muito obrigada por tudo!

Ao **Professor Dr. Glauco Issamu Miyahara** pelo aprendizado proporcionado na disciplina de Estomatologia e por ser sempre compreensivo quando precisei. À **Professora Dr. Sandra Helena Penha de Oliveira** pelo conhecimento adquirido na disciplina de Farmacologia e por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos deste trabalho e de muitos outros de nossa equipe. Agradeço mais uma vez aos dois, pela disponibilidade de participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos **animais** que “deram” a vida para que esta pesquisa fosse realizada e que proporcionaram muito aprendizado a mim em todo o período que estive em laboratório.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa dos professores **Dr. Wilson Roberto Poi**, digníssimo Diretor e **Dr. João Eduardo Gomes Filho**, digníssimo Vice-Diretor. Agradeço pelo acolhimento, oportunidades, infraestrutura e corpo docente de excelência desta faculdade, eu não poderia ter realizado meu sonho em um lugar melhor do que está universidade.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por tornar possível a realização desta pesquisa científica.

Aos **meus pacientes**, pela confiança em mim depositada, pela colaboração e carinho. Agradeço por me proporcionarem bons momentos e muito aprendizado na prática da Odontologia, vocês foram fundamentais para esta conquista! Mais uma vez, obrigada.

A **todos os professores desta Universidade**, por toda dedicação e conhecimento transmitidos. Agradeço por contribuírem de forma tão importante em uma fase inesquecível da minha vida.

As **pessoas que contribuíram direta ou indiretamente** para que este momento fosse possível e este estudo fosse realizado!

***“Um único sonho é mais poderoso do que mil realidades”***

John Ronald Reuel Tolkien

BOTELHO, MCB. Avaliação do comportamento de ansiedade e alterações morfológicas na amígdala do cérebro de ratos submetidos à carcinogênese bucal quimicamente induzida. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista- “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2018

## RESUMO

Estudos demonstram que pacientes com câncer de boca apresentam altos níveis de estresse e ansiedade, o que pode influenciar o tratamento e o prognóstico da doença. Entretanto, os mecanismos cerebrais envolvidos na indução da ansiedade associada ao processo de início e progressão do tumor são pobremente conhecidos. No presente estudo nós avaliamos os efeitos do processo de carcinogênese bucal quimicamente induzido por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) sobre o comportamento de ansiedade e morfologia da amígdala cerebral em ratos. O estudo foi composto por 2 grupos: *Grupo Carcinogênese* - 6 ratos machos Wistar tratados com o carcinógeno 4NQO; e *Grupo Controle* - 6 ratos machos Wistar não submetidos ao tratamento com carcinógeno. Ao atingirem a idade adulta (90 dias) os animais do grupo carcinogênese foram tratados com o carcinógeno 4NQO diluído na água de beber durante 120 dias, enquanto os animais do grupo controle tiveram acesso apenas a água. Antes do início e após os 120 dias de indução da carcinogênese bucal os animais do grupo carcinogênese foram submetidos a teste comportamental específico (labirinto elevado em zero – LEZ) para avaliação dos níveis de ansiedade (pré e pós-carcinogênese) e o grupo controle foi submetido ao teste de ansiedade LEZ somente antes da eutanásia. Análise histopatológica foi realizada para avaliar a ocorrência de lesões linguais no grupo carcinogênese e análise estereológica foi utilizada para avaliação do número e volume de neurônios na amígdala dos cérebros de ambos os grupos. Dos 6 animais do grupo carcinogênese, 4 (66%) desenvolveram displasia severa; 1 (17%) displasia moderada e 1 (17%) carcinoma *in situ*. Em relação aos níveis de ansiedade, foi observado aumento do comportamento ansioso no grupo carcinogênese quando comparado ao grupo controle ( $p=0.0069$ ). Os animais do grupo carcinogênese também apresentaram-se mais ansiosos na fase pós-carcinogênese comparado a fase pré-carcinogênese ( $p=0.0492$ ). Quanto à análise estereológica da amígdala, os animais submetidos à carcinogênese apresentaram maior densidade neuronal na região da amígdala em relação aos animais do grupo controle ( $p=0,0245$ ). Nossos achados fornecem a primeira evidência de que a carcinogênese bucal promovida por carcinógeno químico induz níveis elevados de ansiedade e alterações morfológicas na amígdala cerebral.

Palavras-chave: Carcinogênese. Ansiedade. Amígdala.

BOTELHO, MCB. Evaluation of anxiety-like behavior and morphological changes in amygdala of rats exposed to chemically induced oral carcinogenesis. End of course paper. School of dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2018

### **ABSTRACT**

Studies have shown that oral cancer patients showed high levels of stress and anxiety, which may influence the treatment and the disease prognosis. However, the cerebral mechanisms involved in anxiety induction associated to the tumor beginning and progression are poorly understood. In the present study we evaluated the effects of chemically induced oral carcinogenesis by 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) on the anxiety-like behavior and cerebral amygdala morphology in rats. The study was composed of two groups: Carcinogenesis Group - 6 male Wistar rats treated with 4NQO carcinogen; and Control Group - 6 male Wistar rats not submitted to carcinogenic treatment. When animals reach adulthood (90 days) the carcinogenesis group were treated with 4NQO carcinogen diluted in the drinking water for 120 days, while the control group had access only to water. The animals of carcinogenesis group underwent a specific behavioral test (Elevated Zero Maze - EZM) to evaluate the anxiety-like behavior levels before and after the 120 days of oral carcinogenesis induction (pre and post carcinogenesis) and the control group was submitted to anxiety EZM test only before euthanasia. Histopathological analysis was performed to evaluate the occurrence of lingual lesions in the carcinogenesis group and stereological analysis was used to evaluate the number and volume of neurons in cerebral amygdala of both groups. Of the 6 animals in the carcinogenesis group, 4 (66%) developed severe dysplasia; 1 (17%) moderate dysplasia and 1 (17%) carcinoma in situ. Regarding to anxiety-like behavior levels, an increase in anxious behavior was observed in carcinogenesis group when compared to control group ( $p = 0.0069$ ). The animals of the carcinogenesis group were also more anxious in the post-carcinogenesis phase when in the pre-carcinogenic phase ( $p = 0.0492$ ). As for the stereological analysis of the amygdala, animals submitted to carcinogenesis had higher neuronal density in the amygdala region in relation to control group animals ( $p = 0.0245$ ). Our results provides the first evidence that oral carcinogenesis promoted by chemical carcinogen induces high levels of anxiety and morphological changes in the cerebral amygdala.

**Keywords:** Carcinogenesis. Anxiety. Amygdala.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Fotomicrografia de encéfalo de rato (coloração de Nissl). **A)** Representação da delimitação (em vermelho) da região da amígdala (1.25x). **B)** Marcação de um neurônio (estrela amarela) e seus limites (pontos verdes) ilustrando o método de contagem e delimitação utilizado para avaliação estereológica (400x). 21
- FIGURA 2** **A)** Fotomicrografia de tecido lingual normal sem indução carcinogênica (grupo controle) (H&E, 100x). **B)** Exame microscópico de lesão leucoplásica com displasia (grupo carcinogênese), onde observa-se pleomorfismo celular e nuclear, hiperchromatismo e disceratose (H&E, 100x). 22
- FIGURA 3** **Tempo gasto no braço aberto e número de entradas no braço aberto.** **A)** Os animais submetidos à carcinogênese permaneceram por menor tempo no braço aberto ( $44,00 \pm 9,502s$ ) **em relação ao grupo controle** ( $98,42 \pm 12,93s$ ) ( $p=0.0069$ ), indicando maior comportamento ansioso no grupo submetido ao tratamento com carcinógeno. **B)** Em relação ao número de entradas no braço aberto, análise de ambos os grupos, carcinógeno ( $10,00 \pm 2,517$ ) e grupo controle ( $12,00 \pm 1,653$ ), indicou que não houve diferenças entre os grupos.  $*p<0.05$ . 23
- FIGURA 4** **Tempo gasto no braço aberto e número de entradas no braço aberto no período pré e pós-carcinogênese.** **A)** Os animais submetidos à carcinogênese permaneceram menor tempo no braço aberto no período pós-carcinogênese  $44,00 \pm 9,502$  em relação ao período pré-carcinogênese  $85,33 \pm 15,84$   $p=0.049$ , indicando maior comportamento ansioso neste grupo após indução carcinogênica. **B)** Não houve diferenças significativas quanto ao número de entradas no braço aberto quando comparado o período pré ( $16,17 \pm 2,548$ ) e pós-carcinogênese ( $10,00 \pm 2,517$ ).  $*p<0.05$ . 24
- FIGURA 5** **O processo de carcinogênese aumenta a densidade da amígdala cerebral.** Análise estereológica foi realizada para avaliar a influência do processo de carcinogênese sobre o número de neurônios (A), volume planimétrico (B), densidade neural (C), área celular média (D) e volume celular médio (E) da amígdala cerebral. Resultado estatisticamente significativo foi observado para D no grupo carcinogênese ( $77863 \pm 2380$ ) em relação ao grupo controle ( $68963 \pm 2376$ ) ( $p=0,0245$ ). Não foi observado alterações estatisticamente relevantes para as outras variáveis avaliadas, N (GCar.  $103890 \pm 6589$  e GCont.  $100257 \pm 6947$ ), V (GCar.  $1,332 \pm 0,06554$  e GCont.  $1,447 \pm 0,06500$ ), ACM (GCar.  $124775 \pm 2234$  e GCont.  $131922 \pm 4497$ ) e VCM (GCar.  $117911 \pm 3359$  e GCont.  $126781 \pm 6247$ ). ( $p>0.05$ ). 25

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACM = Área celular média  
CEC = Carcinoma espinocelular  
D = Densidade  
DMSO = Sulfóxido de dimetilo  
EPM = Erro padrão da média  
GCar = Grupo carcinogênese  
GCont = Grupo controle  
HPA = Eixo hipófise-pituitária-adrenal  
LEZ = Labirinto elevado em zero  
N = Número de neurônios  
OMS = Organização Mundial da Saúde  
ROI = Region of interest  
SNA = Sistema Nervoso Autônomo  
SNC = Sistema Nervoso Central  
SL= Sistema Límbico  
SNS = Sistema Nervoso Simpático  
V = Volume planimétrico  
VCM = Volume Celular Médio  
Z = Espessura do dissecador óptico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	15
2.1 Animais e condições experimentais .....	15
2.2 Delineamento Experimental .....	16
2.3 Avaliação do comportamento de ansiedade .....	16
2.3.1 <i>Teste do labirinto elevado em zero (LEZ)</i> .....	17
2.4 Indução da carcinogênese bucal com o carcinógeno 4NQO .....	17
2.5 Perfusão Intracardíaca .....	17
2.6 Extração da língua e processamento laboratorial .....	18
2.6.1 <i>Extração da língua e confecção dos blocos</i> .....	18
2.6.2 <i>Cortes e coloração</i> .....	18
2.7 Extração dos encéfalos e processamento laboratorial .....	19
2.7.1 <i>Extração dos encéfalos e crioproteção</i> .....	19
2.7.2 <i>Microtomia e armazenamento</i> .....	19
2.7.3 <i>Montagem dos cortes nas lâminas histológicas</i> .....	20
2.7.4 <i>Coloração pela técnica de Nissl</i> .....	20
2.8 Avaliação estereológica do número e volume dos neurônios da amígdala ..	20
2.8.1 <i>Delimitação da amígdala</i> .....	21
2.9 Análise estatística .....	21
<b>3. RESULTADOS</b> .....	22
3.1 Diagnóstico histopatológico das lesões linguais .....	22
3.2 Avaliação do comportamento de ansiedade .....	22
3.2.1 <i>O processo de carcinogênese bucal é acompanhada por aumento dos níveis de ansiedade</i> .....	22
3.2.2 <i>Animais tratados com 4NQO apresentaram maiores níveis de ansiedade após o período pós-carcinogênese</i> .....	23
3.3 O processo de carcinogênese quimicamente induzido promove aumento de densidade neuronal na região da amígdala .....	24
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>REFERENCIAS</b> .....	34
<b>ANEXO</b> .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano de 2020, mais de 15 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer, e que mais de 60% destes casos ocorrerão em países em desenvolvimento, como o Brasil<sup>1</sup>. Dentre os tumores de cabeça e pescoço, o câncer de boca é o tipo mais comum, representando cerca de 4% dos tumores malignos em todo o mundo<sup>1,2</sup>. O uso do tabaco e o consumo excessivo de álcool se configuram como os principais fatores de risco para o câncer de boca. O Carcinoma Espinocelular (CEC) representa mais de 90% dos tumores malignos de boca e mais da metade de seus portadores possuem metástases regionais ou à distância no momento do diagnóstico, o que explica o alto índice de mortalidade para a doença.<sup>2-4</sup> Pacientes com câncer de boca apresentam níveis elevados de estresse, ansiedade e depressão em relação aos indivíduos sem a doença<sup>5,6,7</sup>. Estes sintomas emocionais têm ainda mais importância devido às características destes tumores, cujo tratamento pode estar relacionado à desfiguração facial, dor e comprometimento das funções de fonação e mastigação<sup>5,6,7</sup>. Estudos revelam ainda que pacientes com câncer de boca possuem aumento dos níveis de ansiedade e variações de humor, principalmente devido à dificuldade de relacionamentos interpessoais e ao sofrimento psicossocial<sup>7-10</sup>. Segundo Joshua et al.<sup>11</sup> em um estudo recente, conflitos interpessoais, alto-imagem alterada, depressão, uso continuado de tabaco e álcool e diminuição da autoconfiança são apenas alguns dos fatores que atormentam a população de pacientes<sup>11</sup> oncológicos. Aarstad et al.<sup>12</sup> mostraram que níveis elevados de ansiedade estão associados à um pior prognóstico em portadores de CEC de cabeça e pescoço. Além disso, os pacientes que apresentavam metástase regional tinham maiores níveis de ansiedade do que pacientes que possuíam a doença em estágio inicial<sup>11</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 264 milhões de pessoas sofrem com transtornos de ansiedade<sup>13</sup>. A ansiedade é um estado emocional resultante da integração de aspectos fisiológicos e psicológicos da experiência humana<sup>14</sup>. Neste contexto, trata-se de uma resposta adaptativa para lidar com os desafios e situações estressantes, modulada pelo Sistema Límbico (SL)<sup>15</sup>. O SL é caracterizado como um circuito neuronal relacionado às respostas emocionais e aos impulsos motivacionais, abrangendo várias estruturas, tais como: amígdala, córtex

pré-frontal e hipocampo<sup>15-17</sup>. Este sistema também é estreitamente ligado ao Sistema Nervoso Autônomo (SNA), interferindo e regulando funções endócrinas através do hipocampo, além de sua influência na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)<sup>18,19</sup>. O eixo HPA é ativado por sinais externos e internos e seu dinamismo acontece de acordo com um ritmo circadiano de secreção hormonal, principalmente de glicocorticoides que agem em diferentes órgãos, inclusive no cérebro<sup>20</sup>. A atividade do eixo HPA é aumentada quando o organismo é exposto às situações estressantes<sup>19,20,21</sup>. Há evidências de que exista um sistema bidirecional entre o sistema neuroendócrino e o sistema imunológico mediado por substâncias químicas, como o cortisol e citocinas pró-inflamatórias, devido a persistente ativação do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático (SNS)<sup>16</sup>. Sendo assim, o cérebro possui um papel imunorregulador, influenciando as respostas inflamatórias mediadas pelo sistema imune, respostas as quais estão associadas à progressão de alguns tipos de câncer<sup>16,22</sup>.

Desordens emocionais como a depressão e ansiedade induzem à uma desregulação imunológica e aumento da resposta pró-inflamatória, e a magnitude destes efeitos pode acarretar implicações na saúde, como por exemplo, à progressão do câncer<sup>23,24,25</sup>. A inflamação crônica propicia uma reação em cascata que aumenta o estresse oxidativo e pode levar ao dano de estruturas celulares, indução de mutações somáticas, e transformações neoplásicas<sup>26</sup>. A exposição contínua a situações de estresse acarreta um aumento da secreção de cortisol e eleva os níveis de ansiedade, o que pode promover diferentes efeitos para cada região cerebral do SL, como alterações morfológicas e estruturais, que podem influenciar desde à quantidade e o tamanho das espinhas dendríticas até o volume total da área cerebral envolvida<sup>15,24,27</sup>.

A amígdala é uma das principais regiões relacionadas à modulação da ansiedade<sup>14</sup>. Em humanos, a amígdala é dividida em diferentes subáreas ou núcleos, com informações de todas as modalidades: somatossensorial, gustativo, olfativo, visceral, auditivo e visual<sup>28</sup>. Ansiedade, o medo condicionado, a atenção e uma gama de outras funções são modulados pelos núcleos amigdalianos, que ao analisarem as informações interoceptivas e exteroceptivas, estimulam outras regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) para que se inicie a resposta do estímulo inicial<sup>28,30</sup>. Estes núcleos são funcionais e morfologicamente heterogêneos, apresentando

interconectividade complexa<sup>29,30</sup>. A amígdala exerce um efeito modulador sobre as funções emocionais por meio do complexo basolateral e dos seus núcleos medial e central, que se caracterizam por serem os locais das principais projeções amigdalianas para o córtex pré-frontal, hipotálamo e tronco cerebral<sup>30,31</sup>. Existem extensas conexões dentro e fora dos núcleos do complexo amigdalóide, o que indica que há um processamento local das informações para que os aspectos comportamentais possam ser conduzidos para outras regiões cerebrais, como o córtex pré-frontal e hipocampo<sup>32</sup>. Estudos têm caracterizado a amígdala como uma *região neural chave*, por estabelecer uma via de “mão dupla” entre a inflamação periférica e os sintomas psicossociais<sup>30</sup>. Ela fornece respostas comportamentais e emocionais inerentes para cada indivíduo, particularmente as que envolvem respostas aversivas e medo<sup>29-32</sup>. LeDoux e Cicchetti<sup>31</sup> observaram que as projeções amigdalianas para o tronco cerebral podem desencadear a ativação do SNS e então a liberação de fatores pró-inflamatórios<sup>38,31</sup>.

Estudos mostram que lesões amigdalianas extensas ou em seus núcleos central e mediano, reduzem a secreção de hormônios mediadores do eixo HPA, enquanto sua estimulação potencializa esta via neuroendócrina<sup>33</sup>. McEwen et al.<sup>15</sup> evidenciaram que as respostas cerebrais frente ao estresse agudo e principalmente aquelas decorrentes do estresse crônico possuem influências diretas sobre a plasticidade adaptativa do cérebro. Segundo estes mesmos autores, o aumento agudo dos hormônios do estresse aprimora a memória de eventos potencialmente ameaçadores<sup>34</sup>. Em contrapartida, o estresse crônico prejudica a função cognitiva e promove danos às estruturas cerebrais, além de inibir a neurogênese de células granulares no giro dentado hipocampal<sup>15</sup>. Estudos morfológicos em modelo animal demonstraram que o estresse crônico aumenta a arborização e densidade dendrítica na região da amígdala<sup>33-36</sup>. A ocorrência de hipertrofia amigdalóide induzida pelo estresse também foi evidenciada por Vyas et al.<sup>36,37</sup>. Evidências mostram que os efeitos do estresse na indução de hipertrofia da amígdala se perpetuam mesmo após o término do estímulo estressor<sup>38</sup>. A amígdala possui importância crucial na aprendizagem emocional de curto a longo prazo e papel fundamental para os circuitos neurais subjacentes ao estresse e ansiedade<sup>33-38</sup>. Estas características a tornam uma região interessante para a investigação da codificação estrutural de experiências aversivas<sup>31</sup>. Embora pacientes com câncer apresentem níveis elevados de estresse e

ansiedade, inexistem estudos que avaliaram a presença de alterações morfológicas na amígdala durante o processo de indução e progressão da doença.

Estudos demonstram que mais de 70% dos pacientes com CEC de boca consomem algum tipo de bebida alcóolica, enquanto aproximadamente 90% dos pacientes são tabagistas<sup>40,41</sup>. O uso abusivo destas substâncias é apontado como fator preponderante para o início e progressão do CEC de boca em humanos<sup>41</sup>. Além do seu poder carcinogênico em induzir neoplasias malignas de boca, o uso de tabaco e álcool também tem sido associado ao aumento dos níveis de estresse e ansiedade<sup>41,42</sup>. Por exemplo, o uso crônico de álcool pode induzir ativação de regiões cerebrais associada à ansiedade (ex: amígdala), bem como aumentar os níveis cerebrais e sistêmicos dos hormônios associados ao estresse<sup>43</sup>. Nos estudos de carcinogênese bucal o modelo pré-clínico mais utilizado é o modelo de indução de CEC de boca em roedores por meio do carcinógeno químico 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO). O 4NQO é uma substância sintética solúvel em água que induz lesões pré-malignas e malignas na língua de ratos ou camundongos<sup>43</sup>. O tratamento com 4NQO tem se mostrado a melhor opção para a indução de carcinogênese bucal em laboratório, por induzir alterações histopatológicas e moleculares semelhantes às etapas da carcinogênese bucal em humanos<sup>44-48</sup>. Embora níveis elevados de ansiedade têm sido encontrados em pacientes portadores de câncer de boca, ainda não há estudos que avaliaram se o processo de indução deste tipo de tumor induzido quimicamente pode ser acompanhado do aumento dos níveis de ansiedade e de alterações morfológicas em regiões cerebrais específicas.

Neste estudo, utilizaremos um modelo de carcinogênese bucal induzida por 4NQO para avaliar o impacto do processo de carcinogênese quimicamente induzida sobre o comportamento de ansiedade e alterações morfológicas da amígdala no cérebro de roedores.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Animais e condições experimentais**

Todos os experimentos envolvendo animais foram desenvolvidos de acordo com o guia de princípios para uso de animais no laboratório e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Nº

de processo 00496-2016). Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados 12 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Os animais foram mantidos em condições naturais de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), períodos de 12 horas claro e escuro e acesso ad libitum à água e dieta comercial (Purina®, Paulínia-SP, Brasil).

## **2.2 Delineamento Experimental**

Com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com o carcinógeno 4NQO sobre o comportamento de ansiedade e alterações morfológicas da amígdala cerebral, o estudo foi composto por 2 grupos experimentais: 1) Grupo carcinogênese: 6 ratos machos Wistar submetidos à carcinogênese bucal quimicamente induzida por 4NQO; 2) Grupo controle: 6 ratos machos Wistar não submetidos ao tratamento com carcinógeno. Ambos os grupos foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao atingirem a fase adulta (90 dias de idade), os animais do grupo carcinogênese foram submetidos à testes específicos para avaliação dos níveis de comportamento de ansiedade (fase pré-carcinogênese). Após esta análise comportamental os animais foram tratados com o carcinógeno 4NQO durante 120 dias. Os animais do grupo controle foram mantidos nas mesmas condições ambientais, porém não foram submetidos ao tratamento com 4NQO. No final do período experimental (antes da eutanásia) os animais de ambos os grupos, controle e o grupo carcinógeno (fase pós-carcinogênese) foram submetidos aos testes comportamentais de ansiedade. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e as línguas foram coletadas para avaliação da incidência de lesões cancerizáveis (leucoplasia) e carcinoma espinocelular de boca (CEC), e os cérebros foram coletados para análise estereológica das alterações no número e volume dos neurônios na região da amígdala.

## **2.3 Avaliação do comportamento de ansiedade**

Para avaliar se a indução de carcinogênica com 4NQO altera os níveis de ansiedade, os animais foram submetidos ao teste de labirinto elevado em zero. Os animais do grupo carcinogênese foram testados antes do início da carcinogênese (fase pré-carcinogênese) e antes da realização das eutanásias, posteriormente a indução carcinogênica (fase pós-carcinogênese) juntamente com o grupo controle.

### 2.3.1 Teste do labirinto elevado em zero (LEZ)

Primeiramente, as caixas contendo os animais que iriam ser submetidos ao teste comportamental foram levadas a uma sala separada do biotério, onde foram mantidos sem perturbação durante o período de 1 hora para adaptação ao ambiente. Em seguida os animais foram testados no aparelho labirinto elevado em zero (LEZ). Os testes foram realizados sob luz fraca (15 lux). O LEZ consiste em uma arena, composta por dois braços abertos e dois braços fechados. No início de cada ensaio, o animal foi colocado no braço fechado e a exploração do aparelho foi quantificada durante 10 minutos por uma câmara de vídeo montada acima do aparelho. Posteriormente, os vídeos foram analisados pelo software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). O tempo gasto no braço aberto e o número de entradas no braço aberto foram as medidas utilizadas para mensurar os níveis de comportamento ansioso. Os dados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **2.4 Indução da carcinogênese bucal com o carcinógeno 4NQO**

Para a indução do processo de carcinogênese bucal os animais do grupo carcinogênese foram tratados com 50 ppm de 4NQO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diluído na água de beber. Todos os animais tiveram livre acesso para consumir a água, que foi reabastecida duas vezes por semana com solução do carcinógeno recentemente preparada. As garrafas de água com 4NQO eram de cor âmbar marrom para prevenir exposição à luz. Os animais foram submetidos à eutanásia após 120 dias de indução carcinogênica. Este período foi definido com base em estudos prévios<sup>44,48</sup> e em nossa experiência com este modelo de carcinogênese. Após este período os animais de ambos os grupos foram anestesiados e então perfundidos via intracardíaca com solução fixadora (paraformaldeído 4%). As línguas dos animais do grupo carcinogênese foram extraídas para análise histopatológica e os cérebros dos animais de ambos os grupos experimentais foram coletados para a análise estereológica do número e volume dos neurônios da amígdala.

## **2.5 Perfusão Intracardíaca**

Os animais foram anestesiados profundamente, de acordo com seu peso (100 mg/mL cetamina – Dopalen e 20 mg/mL de xilasina - Rompum) e então submetidos a um acesso cirúrgico pelo mediastino com o intuito de alcançar o coração. Por meio de

uma bomba peristáltica (perfusora), os animais foram perfundidos com solução salina (0,9%) à temperatura ambiente em uma quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente (0,5ml/g de peso corporal aproximadamente). A perfusão inicial com solução salina à 0,9% foi utilizada para eliminar o sangue do sistema circulatório e possíveis coágulos que pudessem ser formados, prejudicando a fixação dos tecidos. Após a perfusão da solução salina, uma solução fixadora de paraformaldeído 4% (1ml/g de peso corporal aproximadamente) foi administrada por meio da bomba perfusora.

## **2.6 Extração da língua e processamento laboratorial.**

### **2.6.1 Extração da língua e confecção dos blocos**

Após a perfusão, as línguas dos animais foram extraídas e seccionadas longitudinalmente para as análises histopatológicas. Os tecidos foram fixados em formaldeído tamponado (Merck, Darmstadt, Germany) à 10% por 48 horas. Em seguida, os tecidos foram submetidos à macroscopia por patologista bucal experiente. Posteriormente as línguas foram submetidas ao processamento histotécnico, que consistiu em desidratação, diafanização, inclusão na parafina e por fim emblocamento em parafina.

### **2.6.2 Cortes e coloração**

Transcorridas 24 horas após a etapa de emblocamento os blocos foram seccionados utilizando-se um micrótomo rotativo. Foram realizados cortes de 5 micrometros que posteriormente foram colocados em banho-maria (aproximadamente 45 °C). Após posicionar os cortes nas lâminas, as mesmas foram colocadas em estufa onde eram aquecidas para derretimento da parafina, possibilitando uma fixação maior dos cortes na lâmina. A coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) foi realizada logo em seguida, com desparafinização completa dos cortes e depois coloração com ambos os corantes. Na última etapa desta fase foi realizada a montagem das laminulas sobre as lâminas já coradas.

### **2.6.3 Avaliação da incidência de lesões linguais induzidas por 4NQO**

A análise histopatológica foi por um patologista bucal experiente com base nas alterações histopatológicas típicas que ocorrem durante a carcinogênese da mucosa

bucal. Foi avaliada a ocorrência das seguintes condições microscópicas: epitélio normal, hiperplasia e hiperqueratose, displasia epitelial, CEC in-situ, CEC microinvasivo e CEC invasivo<sup>51</sup>. Para o diagnóstico de displasia epitelial foram utilizados os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>51</sup> e de Katz et al.<sup>52</sup>

## **2.7 Extração dos encéfalos e processamento laboratorial**

### **2.7.1 Extração dos encéfalos e crioproteção**

Finalizada a perfusão e a extração da língua, foi realizada a abertura do crânio e o encéfalo foi dissecado cuidadosamente. Os encéfalos foram delicadamente removidos, pesados, e mantidos por duas horas em solução fixadora (formaldeído) a 4°C. Para evitar contração, os cérebros foram deixados durante 3 dias submersos em solução crioprotetora composta de glicerol 10% e sulfóxido de dimetilo (DMSO) 2% dissolvidos em tampão fosfato 0,1M; pH 7,3, a 4°C. Em seguida, os cérebros foram colocados por mais 4 dias em solução de glicerol 20% e DMSO 2% dissolvidos no mesmo tampão, a 4°C, conforme descrito por Rosene et al<sup>49</sup>.

### **2.7.2 Microtomia e armazenamento**

Subsequentemente à crioproteção, os encéfalos foram submetidos à microtomia por congelamento, onde os mesmos eram congelados e seccionados coronariamente à 40µm de espessura. Para proceder esta etapa, a plataforma do micrótomo estava completamente congelada. Para isso foi utilizado gelo seco e álcool abundantemente, além de uma solução à base de sacarose, que era gotejada sobre a plataforma para fixação das peças (encéfalos). Organizados, normalmente numa faixa de três por etapa, os encéfalos eram colocados sobre a plataforma, de modo que permanecessem a uma distância adequada um do outro. Então, solução de sacarose foi gotejada sobre os encéfalos para que os mesmos ficassem bem fixados e completamente congelados. Os cortes foram coletados em seis séries e inseridos em placas de cultura devidamente nomeadas e preenchidas com solução anti-congelante. Em seguida, eram levados ao freezer e conservados a aproximadamente, -20°C. Uma série foi utilizada para realização da coloração de Nissl e as outras cinco séries foram reservadas para análises futuras.

### 2.7.3 Montagem dos cortes nas lâminas histológicas

Os cortes, antes de serem organizados adequadamente e montados, passaram por um processo de lavagem em tampão fosfato 0,1M e água destilada, afim de eliminar qualquer resquício de solução anti-congelante. Em seguida, os cortes foram colocados em poços de placas de cultura preenchidas com solução tampão, gotejando-se três gotas de formaldeído P.A. 37%. A série então voltava para a geladeira onde permanecia por mais quatro dias. Após este período, os cortes foram devidamente montados nas lâminas e colocados na estufa à temperatura ambiente por quatro dias.

### 2.7.4 Coloração pela técnica de Nissl

Anteriormente à montagem dos cortes e coloração, as lâminas passavam por um processo de dupla-gelatinização para garantia de maior fixação dos cortes em suas respectivas lâminas. A coloração preconizada em nosso protocolo foi a coloração de Nissl, realizada com o corante Tionina<sup>50</sup>. As lamínulas foram montadas logo após a coloração.

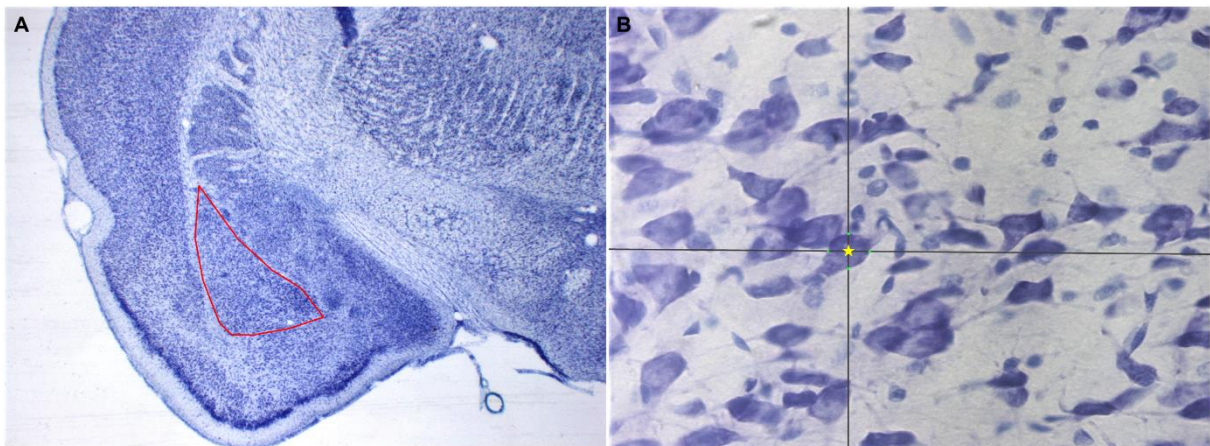
## **2.8 Avaliação estereológica do número e volume dos neurônios da amígdala**

Para avaliar a influência da carcinogênese bucal quimicamente induzida sobre o número e volume dos neurônios da amígdala no cérebro dos ratos, as lâminas histológicas foram analisadas por meio de técnica estereológica em um microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com platina motorizada e câmera digital conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator 11 (Microbrightfield, EUA). Para a quantificação estereológica do número de células foi utilizado o método do fracionador óptico. A superfície da caixa de contagem e seu número dentro de cada ROI (*region of interest*) foram estimados em contagem de teste, de forma a incluir um mínimo de 300 células contadas em cada animal. A espessura do disector óptico (Z) foi ajustada de acordo com a espessura real do corte, que foi determinada após os processos de coloração e desidratação. A avaliação estereológica foi feita por avaliadores cegos aos grupos experimentais. Mensurou-se o número de neurônios (N), o volume celular médio (VCM), o volume planimétrico da área (V), área celular média (ACM) e densidade neuronal (D). Para determinar a estimativa do número de células dentro da ROI (N) o programa utiliza a fórmula:  $N = (\Sigma Q) (1/ssf) (1/asf) (1/tsf)^{53}$ .

Os parâmetros de contagem foram ajustados de forma a obter um coeficiente de erro (Gundersen)  $\leq 0,06$ .

### 2.8.1 Delimitação da amígdala

Um dos critérios para uma análise estereológica adequada e de possível reprodução para os demais pesquisadores, é a delimitação correta da área a ser avaliada. Infelizmente é um pouco confusa por existirem diversas nomenclaturas e limites proposto quando se diz respeito a região da amígdala. Em nosso estudo, utilizamos os parâmetros (limites) e nomenclaturas do Atlas Brain Maps (Structure of the Rat Brain) de Larry Swanson. Neste trabalho, quando utilizarmos a denominação amígdala complexo basolateral, nos referimos aos núcleos lateral e basolateral. Utilizamos como parâmetro principal para delimitação o envolvimento da região pela cápsula externa, totalizando nove secções para cada animal analisado. Selecionava-se as secções a partir do momento em que se observava o complexo basolateral, com aspecto semelhante à uma gota, e a partir daí os cortes eram selecionados sucessivamente até a dissociação dos núcleos do complexo basolateral. (Figura 1A e 1B)



**Figura 1.** Fotomicrografia de encéfalo de rato (coloração de Nissl). **A)** Representação da delimitação (em vermelho) da região da amígdala (12,5x). **B)** Marcação de um neurônio (estrela amarela) e seus limites (pontos verdes) ilustrando o método de contagem e delimitação utilizado para avaliação estereológica (400x).

## 2.9 Análise estatística

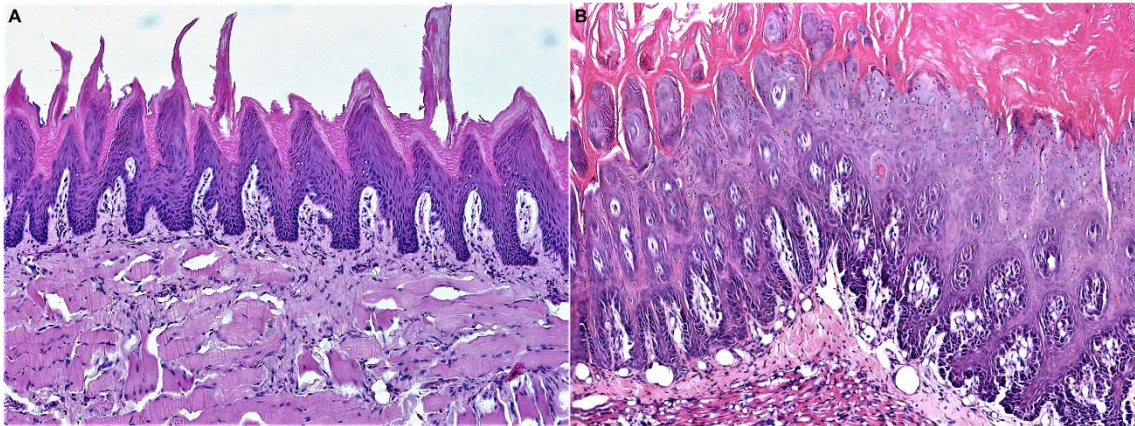
Para avaliar se o tratamento com 4NQO influencia o comportamento de ansiedade e alterações cerebrais foram utilizados o teste *t* de *student* utilizando-se o programa Prisma. Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da

média (EPM). O nível crítico foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ) para se admitir diferenças de valores como estatisticamente significantes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Diagnóstico histopatológico das lesões linguais

A análise histopatológica foi realizada para avaliar a incidência de lesões linguais no grupo submetido à carcinogênese bucal. Todos os seis animais pertencentes a este grupo desenvolveram apenas leucoplasias e nenhum carcinoma inicial ou invasivo foi observado. Segundo os critérios da OMS para diagnóstico de displasias epiteliais, 4 animais (66%) desenvolveram displasia severa; 1 animal (17%) displasia moderada e apenas 1 animal (17%) carcinoma *in situ* (Figura 2).



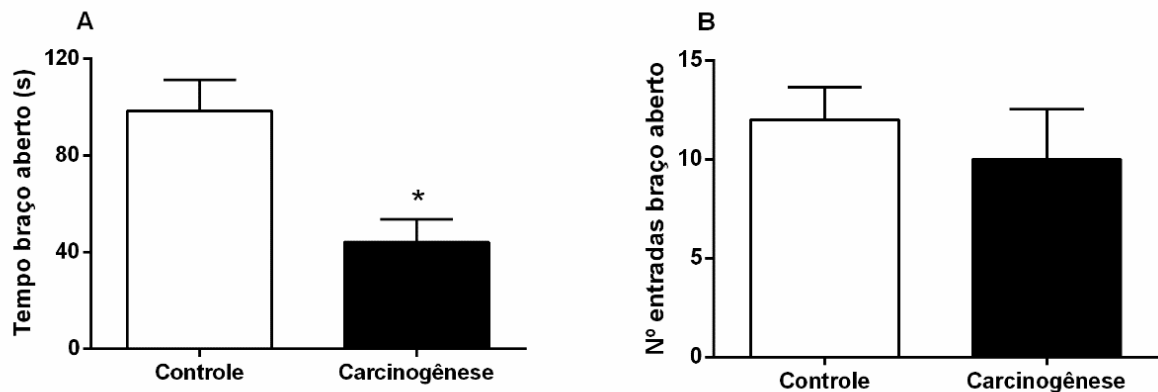
**Figura 2.** **A)** Fotomicrografia de tecido lingual normal sem indução carcinogênica (grupo controle) (H&E, 100x). **B)** Exame microscópico de lesão leucoplásica com displasia (grupo carcinogênese), onde observa-se pleomorfismo celular e nuclear, hiperchromatismo e disceratose (H&E, 100x).

#### 3.2 Avaliação do comportamento de ansiedade.

##### 3.2.1 O processo de carcinogênese bucal é acompanhada por aumento dos níveis de ansiedade

Para avaliar se o processo de carcinogênese bucal quimicamente induzido altera os níveis de ansiedade, os animais de ambos os grupos foram submetidos ao teste do labirinto elevado em zero (LEZ) antes da eutanásia. Os resultados mostraram que os animais submetidos à carcinogênese bucal permaneceram menor tempo no braço aberto ( $44,00 \pm 9,502s$ ) quando comparado ao grupo controle ( $98,42 \pm 12,93s$ ) ( $p=0.0069$ ) (Figura 3A). Este resultado indica que os animais submetidos à carcinogênese bucal foram mais ansiosos em relação aos animais que não foram

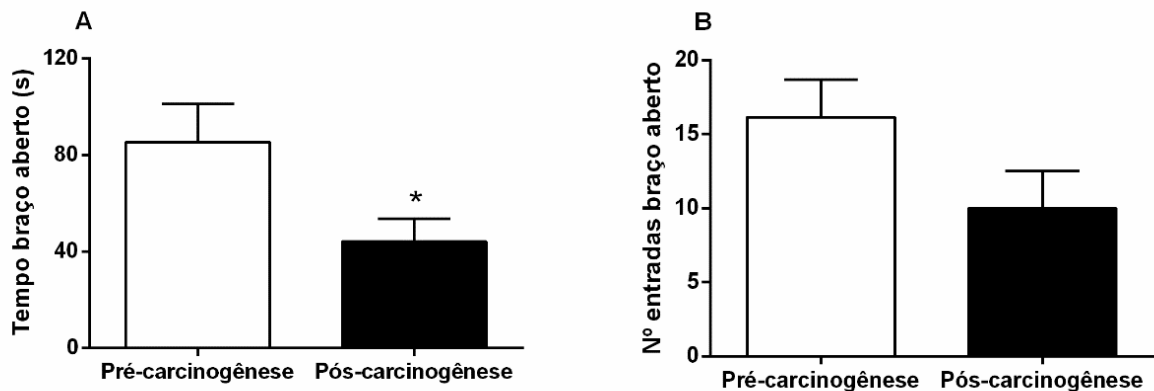
tratados com o carcinógeno 4NQO. Em relação ao número de entradas no braço aberto, não foram observadas diferenças entre o grupo controle ( $12,00 \pm 1,653$ ) e o grupo carcinogênese ( $10,00 \pm 2,517$ ) ( $p=0.5216$ ) (Figura 3B).



**Figura 3. Tempo gasto no braço aberto e número de entradas no braço aberto. A)** Os animais submetidos à carcinogênese permaneceram por menor tempo no braço aberto ( $44,00 \pm 9,502$ s) em relação ao grupo controle ( $98,42 \pm 12,93$ s) ( $p=0.0069$ ), indicando maior comportamento ansioso no grupo submetido ao tratamento com carcinógeno. **B)** Em relação ao número de entradas no braço aberto, a análise de ambos os grupos, carcinógeno ( $10,00 \pm 2,517$ ) e grupo controle ( $12,00 \pm 1,653$ ), indicou que não houve diferenças entre os grupos. \* $p<0.05$ .

### 3.2.2 Animais tratados com 4NQO apresentaram maiores níveis de ansiedade após o período pós-carcinogênese

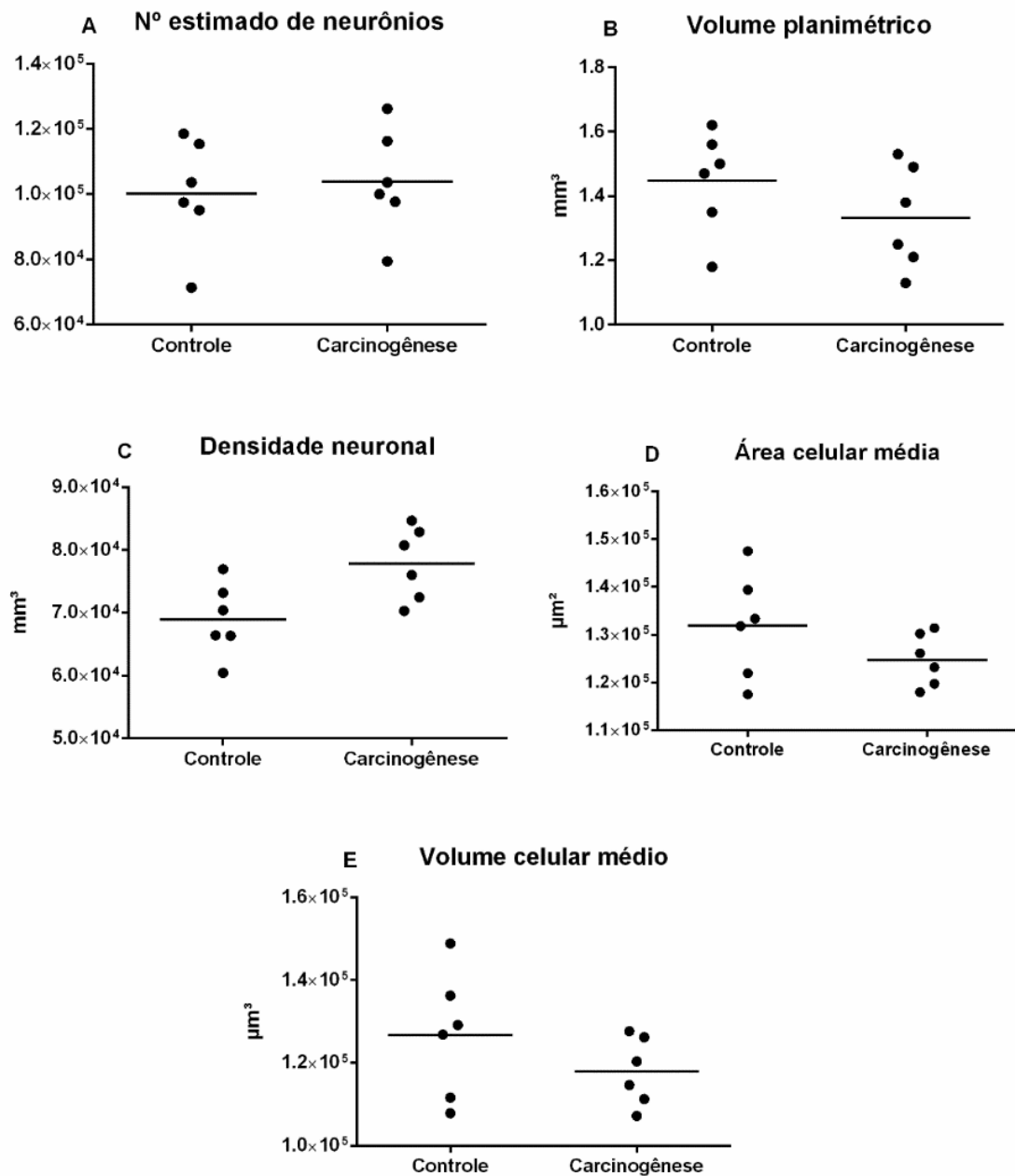
Para avaliar se os animais tratados com o carcinógeno 4NQO apresentavam alteração dos níveis de ansiedade em relação ao período pré-tratamento (basal), os animais do grupo carcinogênese foram submetidos ao LEZ em dois momentos distintos (antes e após a indução da carcinogênese). Os resultados revelaram que os animais exploraram por menor tempo o braço aberto após terem sido submetidos ao tratamento com 4NQO ( $44,00 \pm 9,502$ ) quando comparados com o comportamento avaliado na fase pré-carcinogênese ( $85,33 \pm 15,84$ ) ( $p=0.0492$ ) (Figura 4A). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de entradas no braço aberto quando o comportamento da fase pré-carcinogênese ( $16,17 \pm 2,548$ ) foi comparado com o da fase pós-carcinogênese ( $10,00 \pm 2,517$ ) ( $p=0.1158$ ) (Figura 4B).



**Figura 4. Tempo gasto no braço aberto e número de entradas no braço aberto no período pré e pós-carcinogênese. A)** Os animais submetidos à carcinogênese permaneceram menor tempo no braço aberto no período pós-carcinogênese  $44,00 \pm 9,502$  em relação ao período pré-carcinogênese  $85,33 \pm 15,84$   $p=0.049$ , indicando maior comportamento ansioso neste grupo após indução carcinogênica. **B)** Não houve diferenças significantes quanto ao número de entradas no braço aberto quando comparado o período pré ( $16,17 \pm 2,548$ ) e pós-carcinogênese ( $10,00 \pm 2,517$ ).  $*p<0.05$ .

### 3.3 O processo de carcinogênese quimicamente induzido promove aumento de densidade neuronal na região da amígdala.

A avaliação da influência da carcinogênese bucal quimicamente induzida sobre o número e volume dos neurônios da amígdala foi realizada em ambos os grupos experimentais por meio de técnica estereológica. Para esta análise foram utilizadas os valores: número estimado de neurônios (N), volume planimétrico (V), densidade (D), área celular média (ACM) e volume celular médio (VCM). Os animais submetidos à carcinogênese apresentaram maior densidade neuronal (N/V) na região da amígdala ( $77863 \pm 2380$ ) quando comparados aos animais do grupo controle ( $68963 \pm 2376$ ) ( $p=0,0245$ ). Porém, não foi observado diferenças para os valores N (GCar.  $103890 \pm 6589$  e GCont.  $100257 \pm 6947$ ), V (GCar.  $1,332 \pm 0,06554$  e GCont.  $1,447 \pm 0,06500$ ), ACM (GCar.  $124775 \pm 2234$  e GCont.  $131922 \pm 4497$ ) e VCM (GCar.  $117911 \pm 3359$  e GCont.  $126781 \pm 6247$ ) ( $p>0.05$ ) (Figura 5).



**Figura 5. O processo de carcinogênese aumenta a densidade da amígdala cerebral.** Análise estereológica foi realizada para avaliar a influência do processo de carcinogênese sobre o número de neurônios (A), volume planimétrico (B), densidade neural (C), área celular média (D) e volume celular médio (E) da amígdala cerebral. Resultado estatisticamente significativo foi observado para C no grupo carcinogênese ( $77863 \pm 2380$ ) em relação ao grupo controle ( $68963 \pm 2376$ ) ( $p=0,0245$ ). Não foi observado alterações estatisticamente relevantes para as outras variáveis avaliadas, N (GCar.  $103890 \pm 6589$  e GCont.  $100257 \pm 6947$ ), V (GCar.  $1,332 \pm 0,06554$  e GCont.  $1,447 \pm 0,06500$ ), ACM (GCar.  $124775 \pm 2234$  e GCont.  $131922 \pm 4497$ ) e VCM (GCar.  $117911 \pm 3359$  e GCont.  $126781 \pm 6247$ ) ( $p>0.05$ )

#### 4. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da carcinogênese quimicamente induzida sobre o comportamento de ansiedade e morfologia da amígdala cerebral em um modelo pré-clínico de câncer de boca. Nossos resultados demonstraram um aumento dos níveis de ansiedade avaliados pelo teste LEZ nos animais do grupo tratado com o carcinógeno químico 4NQO em comparação com os animais não submetidos à carcinogênese bucal. Além disso, quando o comportamento dos animais após o tratamento com 4NQO foi comparado com o comportamento antes do início do tratamento, os níveis de ansiedade também foram aumentados após o tratamento com o carcinógeno. Com a análise estereológica da região da amígdala, foi observado que a indução da carcinogênese bucal também promoveu alterações de densidade na área avaliada, sendo que os animais tratados com carcinógeno apresentaram maior densidade amigdaliana em relação ao grupo controle. Mesmo com o advento de novos tratamentos e estudos buscando maior compreensão sobre o início e progressão tumoral, o câncer ainda promove taxas elevadas de morbidade e sua influência sobre os fenômenos emocionais abala a qualidade de vida dos pacientes<sup>16,54</sup>. Estresse físico e emocional, ansiedade e depressão estão comumente presentes na vida de pacientes oncológicos, desde a fase de diagnóstico até o período pós-tratamento<sup>5-8,55-56</sup>. Muitos destes efeitos psicológicos são acarretados pela dor advinda das lesões para comer e deglutir, pela dificuldade de fonação, caquexia e desfiguração facial<sup>5</sup>. Já se sabe que fatores biocomportamentais como estresse e ansiedade afetam uma variedade de características importantes da biologia tumoral.<sup>16,23,24,26</sup> O estresse crônico pode determinar uma secreção anormal de hormônios, como os glicocorticoides e as catecolaminas que podem atuar em eventos fisiopatológicos essenciais para a progressão do câncer<sup>16,24,26</sup>. Em um recente estudo

de nosso grupo, Bastos et al.<sup>57</sup> demonstraram que pacientes com CEC de boca e orofaringe exibiram maiores níveis plasmáticos de catecolaminas em relação a pacientes com leucoplasia. Valente et al.<sup>58</sup>, observaram que a indução de câncer de boca com o carcinógeno químico 4NQO aumenta os níveis de hormônios do estresse, como a corticosterona e norepinefrina, no microambiente tumoral de lesões linguais<sup>58</sup>. O modelo de carcinogênese química por 4NQO determina o aparecimento de lesões leucoplásicas (não-neoplásicas) e tumorais com alta similaridade histopatológica e bioquímica com as lesões desenvolvidas em humanos<sup>59</sup>. Este carcinógeno químico também apresenta a vantagem de ser de fácil preparo e administração, já que é administrado para os animais através de sua diluição na água de beber<sup>59-60</sup>. A atuação do 4QNO sobre o DNA celular promove uma instabilidade genômica e propensão para o desenvolvimento de tumores<sup>59</sup>. Entretanto, para nossa surpresa, os animais do grupo carcinógeno não apresentaram lesões neoplásicas invasivas. Os resultados do presente estudo mostraram que quase todos os animais tratados durante 4 meses com 4NQO apresentaram diagnóstico final de displasia severa, sendo que somente um animal desenvolveu CEC *in-situ*, um estágio inicial do câncer de boca. Como estas lesões são restritas ao epitélio e não invadem o tecido conjuntivo, provavelmente os tumores dos animais do grupo carcinogênese eram ainda assintomáticos. O desenvolvimento destas lesões assintomáticas, anulam o viés da dor crônica acarretada por elas em portadores da doença, e que na maioria dos casos em humanos está relacionada com o aumento dos níveis de ansiedade<sup>61</sup>. O fato de que mesmo apresentando lesões insipientes os animais submetidos à carcinogênese tenham apresentado níveis elevados de ansiedade, pode indicar que o comportamento de ansiedade nestes animais seja derivado de uma ação direta do

carcinógeno e não de dor ou mediadores inflamatórios liberados periféricamente pelo próprio tumor.

Independentemente do tamanho das lesões linguais e de seu resultado histopatológico, a análise do teste LEZ constatou que o tratamento com o carcinógeno 4NQO alterou significativamente os níveis de ansiedade. De acordo com nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a avaliar o efeito do tratamento com um carcinógeno químico sobre o comportamento de ansiedade. O carcinógeno 4NQO é classicamente conhecido na literatura e caracterizado como uma das melhores opções para indução do câncer de boca em roedores<sup>59-60</sup>. O mecanismo de indução carcinogênica do 4NQO é bastante semelhante aos danos impostos pelos agentes carcinógenos presentes no tabaco, que juntamente com o álcool, se configuram como os principais agentes etiológicos para o câncer de boca<sup>44,47</sup>. Estas substâncias além de possuírem um efeito carcinogênico poderoso, também são investigadas quanto sua associação com o aumento dos níveis de estresse e ansiedade<sup>1,2</sup>. O tabaco possui cerca de sessenta agentes cancerígenos diferentes em sua composição e seu efeito sobre o comportamento de ansiedade ainda é bastante controverso<sup>1-2, 42-43</sup>. Estudos em animais já evidenciaram que a administração de nicotina promove uma desregulação do eixo HPA com uma hipersecreção de cortisol e alterações na atividade dos neurotransmissores monoamínicos (ex.: norepinefrina e dopamina) elevando os níveis de estresse e ansiedade<sup>62,63</sup>. File et al.<sup>64</sup> revelaram que a administração de nicotina possui efeitos ansiolíticos através da diminuição da ansiedade ou ansiogênicos, elevando os níveis de ansiedade, que são relacionados a área do cérebro que é estimulada por esta droga. Alguns pesquisadores apontaram que o efeito da nicotina como agente modulador da ansiedade depende diretamente do tempo e severidade da exposição ao tabaco, onde a exposição crônica a tal vício

aumenta consideravelmente a susceptibilidade individual para a ocorrência de desordens emocionais<sup>63,64</sup>.

O álcool também é um fator preponderante para a ocorrência do câncer de boca e os estudos mostram que seu mecanismo de indução da ansiedade é relacionado, da mesma forma que o fumo, de acordo com a frequência e o tempo que o vício perdura. Haveria, portanto uma ansiedade ligada ao desejo pela droga e, conseqüentemente, o aumento de seu consumo<sup>43,64-65</sup>. Segundo Pleil et al.<sup>65</sup> a ansiedade gerada por este feedback pode ser medida por meio da plasticidade aberrante de certas regiões cerebrais que regulam comportamentos de busca e recompensa, em particular, as regiões límbicas como a amígdala. Nossa hipótese inicial de que os animais tratados com o carcinógeno 4NQO se mostrassem mais ansiosos no teste LEZ foi confirmada após análise dos vídeos. Visto que os animais submetidos à carcinogênese bucal apresentaram um aumento do comportamento de ansiedade em comparação ao grupo controle e a fase pré-carcinogênese, nossa hipótese inicial era a de que o carcinógeno 4NQO também atuasse sobre o cérebro, através da modulação das estruturas envolvidas com o comportamento de ansiedade, como a amígdala e o hipocampo. Ou seja, de que a mesma substância é capaz de induzir as lesões neoplásicas bucais também promoveriam alterações estruturais no Sistema Nervoso Central (SNC), que pudessem ter influências importantes sobre o comportamento.

Para avaliar a possível interferência da indução da carcinogênese bucal por 4NQO sobre a morfologia da amígdala, sua contagem estereológica do número de neurônios nesta região cerebral foi realizada. Os resultados apontaram que o tratamento com o carcinógeno químico induziu aumento significativo da densidade dos neurônios na região da amígdala. Descobertas envolvendo o hipocampo,

possibilitaram o estudo de outra região cerebral, a amígdala<sup>28,32,66</sup>. Caracterizada como sendo o centro do processamento emocional, a amígdala consiste em dois pequenos núcleos localizados entre os lobos temporais mediais do cérebro e desempenha um papel crítico no estabelecimento das experiências emocionais e na consolidação de memórias<sup>28,32</sup>. O complexo amigdaliano, é dividido em núcleo basolateral da amígdala (BLA), núcleo central da amígdala (CeA) e o núcleo medial da amígdala (MeA)<sup>28,66</sup>. O BLA foi o complexo avaliado estereologicamente neste estudo, tratando-se de uma região cerebral intimamente relacionada com a consolidação de memórias e resposta ao estresse e ansiedade. Além disso, possui marcadas conexões com o córtex pré-frontal (CPF), núcleo paraventricular do hipotálamo (VPN), com o hipocampo e também com os outros núcleos da amígdala<sup>28,31</sup>. A amígdala orchestra um conjunto de reações fisiológicas e respostas cognitivas provocadas pela experiência estressante, entre elas, o aumento da secreção de hormônios adrenais através de suas eferências ao núcleo da estria terminal e tronco encefálico<sup>31,67-68</sup>. Estudos sugerem uma ligação notável entre a remodelação neuronal na amígdala e aumento volumétrico da própria região, em decorrência ao estresse e o desenvolvimento do comportamento de ansiedade<sup>15,36,33</sup>. Welsch et al<sup>69</sup>, em 1969, por meio de um estudo em animais, evidenciaram que lesões em áreas específicas do SNC, como o hipotálamo e amígdala, podem influenciar no início e progressão de tumores no tecido mamário de ratas submetidas ao tratamento com carcinógeno *DMBA* (7,12-dimetilbenzantraceno). Vyas et al.<sup>36</sup>, demonstraram que a resposta da amígdala é diferente para o tipo de estresse crônico aplicado e evidenciaram que o aumento da densidade dendrítica estava relacionado ao aumento da ansiedade. Sabe-se que a hipertrofia neuronal induzida pelo estresse está intimamente relacionada ao aumento dos níveis de ansiedade<sup>33,36</sup>).

O aumento da densidade neuronal da amígdala observado e o comportamento de ansiedade nos animais submetidos à carcinogênese bucal resultou em duas possíveis hipóteses. O fato de que mesmo apresentando lesões insipientes os animais submetidos à carcinogênese tenham apresentado níveis elevados de ansiedade, pode indicar que o comportamento de ansiedade nestes animais seja derivado de uma ação direta do carcinógeno e não de dor ou mediadores inflamatórios liberados periféricamente pelo próprio tumor. Como as lesões dos animais submetidos à carcinogênese se tratavam de lesões insipientes e de que mesmo assim tenham apresentado níveis elevados de ansiedade a primeira hipótese, como já foi mencionado anteriormente, é a de que o comportamento de ansiedade nesse grupo seja promovido por uma alteração direta do carcinógeno e não de dor ou mediadores inflamatórios liberados periféricamente pelo próprio tumor. Esta hipótese consiste na atuação do carcinógeno (ou de seus metabólitos) diretamente sobre o SNC, através de seu transporte através da barreira hematoencefálica e indução de alterações morfológicas na amígdala. A segunda hipótese é de que o carcinógeno aumente os níveis de substâncias estressoras (como os hormônios do estresse) e estas substâncias atuem no SNC. A literatura é escassa na investigação das possíveis alterações amigdalinas em decorrência do estresse e da ansiedade em pacientes com câncer. Em um deles, Matsuoka et al.<sup>70</sup> utilizando ressonância magnética funcional avaliaram o volume da amígdala em sobreviventes de câncer que possuíam lembranças intrusivas, ou seja, que sofriam de estresse pós-traumático. Estes pesquisadores descobriram que recordações relacionadas a doença eram acompanhadas de ansiedade mesmo após três anos da última cirurgia realizada no paciente e que estes pacientes apresentavam um volume total significativamente menor da amígdala, em comparação com pacientes que não sofriam com as

lembranças intrusivas<sup>70</sup>. Porém, a grande limitação em comparar estes estudos com experimentos em seres humanos e o nosso estudo baseado em um modelo animal, é de que os mecanismos neurobiológicos e sua influência na formação de memórias emocionais nos roedores não está bem esclarecido ainda em relação ao que já se sabe sobre estes mecanismos nos seres humanos. Entretanto, diante de estudos anteriores e de nossos resultados, os dados obtidos até o momento não são o bastante para confirmar se o aumento da densidade neuronal presente no grupo carcinógeno foi resultante da diminuição volumétrica absoluta da amígdala ou se o processo de carcinogênese atuou sobre a neurogênese da região, aumentando o número das células neuronais e portanto, de sua densidade. Análises complementares precisam ser realizadas para avaliar se o volume absoluto da amígdala dos animais submetidos à carcinogênese bucal apresenta alterações quando comparado ao grupo controle.

O presente estudo apresenta algumas limitações como o fato dos animais terem desenvolvido apenas lesões insipientes e que o volume absoluto da amígdala não foi avaliado. Frente a isso, análises complementares serão realizadas para avaliar o volume absoluto da amígdala cerebral pela técnica de Cavallieri e também estudar o comportamento e a morfologia da amígdala de animais portadores de CECs de boca induzidos quimicamente mais extensos e invasivos. Além disso, é fundamental o estudo de outras regiões cerebrais responsáveis pela modulação do estresse e da ansiedade. Os resultados do presente estudo revelam que o processo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pode vir acompanhado de aumento dos níveis de estresse e ansiedade, o que pode ser resultante de alterações estruturais e morfológicas no SNC. O aumento na densidade da amígdala representa uma hiperatividade desta região, que não tem seus danos limitados localmente <sup>15,36,66</sup>.

Uma desregulação amigdaliana ocasionada pelo estresse induzido pelo carcinógeno químico poderia levar a uma desregulação do eixo HPA, o que poderia acompanhar o início e progressão do câncer de boca. Além disso, mudanças estruturais da amígdala poderiam induzir diminuição da capacidade cognitiva associada ao surgimento de desordens emocionais como a ansiedade e depressão <sup>31, 66-68</sup>.

## **5. CONCLUSÃO**

A carcinogênese bucal promovida por carcinógeno químico induz níveis elevados de ansiedade e pode ser acompanhada por alterações morfológicas na amígdala cerebral.

## REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO). Cancer. Fact sheet n° 297. Feb. 2006. Geneva.:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.
2. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12): 2893-917.
4. Sadick M, Schoenberg SO, Hoermann K, Sadick H. Current oncologic concepts and emerging techniques for imaging of head and neck squamous cell cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 11.
5. Kugaya A, Akechi T, Okamura H, Mikami I, Uchitomi Y. Correlates of depressed mood in ambulatory head and neck cancer patients. *Psychooncology*. 1999 Nov-Dec;8(6):494-9.
6. McDaniel JS, Musselman DL, Porter MR, Reed DA, Nemeroff CB. Depression in patients with cancer. Diagnosis, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Feb;52(2):89-99.
7. Arilane da Silva Vasconcelos, Cristina Costa, Leopoldo Nelson Fernandes Barbosa. Do Transtorno da Ansiedade ao Câncer. *Rev. SBPH v.11 n.2 Rio de Janeiro dez. 2008.pag.10-14*.
8. Agarwal SK, Munjal M, Koul R, Agarwal R. Prospective evaluation of the quality of life of oral tongue cancer patients before and after the treatment. *Ann Palliat Med*. 2014 Oct;3(4):238-43.
9. Gold D. The psychosocial care needs of patients with HPV-related head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2012 Aug;45(4):879-97
10. Rhoten BA, Murphy B, Ridner SH. Body image in patients with head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncol*. 2013 Aug;49(8):753-60.
11. Smith JD, Shuman AG, Riba MB. Psychosocial Issues in Patients with Head and Neck Cancer: an Updated Review with a Focus on Clinical Interventions. *Curr Psychiatry Rep*. 2017 Sep;19(9):56.
12. Aarstad HJ, Aarstad AK, Heimdal JH, Olofsson J. Mood, anxiety and sense of humor in head and neck cancer patients in relation to disease stage, prognosis and quality of life. *Acta Otolaryngol*. 2005 May;125(5):557-65.
13. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

14. Gelfuso ÉA, Rosa DS, Fachin AL, Mortari MR, Cunha AO, Belebani RO. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
15. McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 886, 172–189.
16. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004 Oct;5(10):617-25.
17. Pessoa L, Hof PR. From Paul Broca's great limbic lobe to the limbic system. *JComp Neurol*. 2015 Dec 1;523(17):2495-500.
18. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry*. 1937;38:725-43.
19. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Dec;29(8):1201-13.
20. Keller-Wood M. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. *Compr Physiol*. 2015 Jul 1;5(3):1161-82.
21. Pergher GK, Grassi-Oliveira R, De Ávila LM, Stein LM. Memória, emoção e humor. *Rev Psiquiatr RS*. 2006;1(28):61-8.
22. Powell ND, Tarr AJ, Sheridan JF. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain Behav Immun*. 2013 Mar; 30 Suppl:S41-7.
23. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005;5(3):243-251.
24. Jankord R, Herman JP. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1148:64-73.
25. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol*. 2003 Aug;24(8):444-8.
26. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):240-248.
27. Leuner B, Shors TJ. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience*. 2013 Oct 22;251:108-19.
28. LeDoux J. The amygdala. *Curr Biol*. 2007 Oct 23;17(20):R868-74. Review.
29. FACCIONI-HEUSER, M. C.; ZANCAN, D; Souza, M.A.L..Amígdala medial pósterio-ventral: caracterização ultra-estrutural e volume somático neuronal em ratos machos e fêmeas ao longo do ciclo estral. 2006.
30. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating

- reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*. 2011 Mar 17;471(7338):358-62.
31. LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P., Reis, D.J., 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* 8, 2517–2529.
  32. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):803-34.
  33. Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B.S., Vyas, A., Chattarji, S., 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9371–9376.
  34. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Ver Neurosci.* 2009
  35. Muscatell KA, Eisenberger NI, Dutcher JM, Cole SW, Bower JE. Links between inflammation, amygdala reactivity, and social support in breast cancer survivors. *Brain Behav Immun.* 2016 Mar;53:34-38.
  36. Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 22, 6810–6818.
  37. Vyas, A., Bernal, S., Chattarji, S., 2003. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res.* 965, 290–294.
  38. Vyas, A., Pillai, A.G., Chattarji, S., 2004. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience* 128, 667–673.
  39. Poeggl G, Helmeke C, Abraham A, Schwabe T, Friedrich P, Braun K. Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):16137-42.
  40. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Acesso em 05 de Abril de 2017
  41. World Health Organization (WHO). Cancer. Fact sheet n° 297. Feb. 2006. Geneva.: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.
  42. Christensen NJ, Jensen EW. Sympathoadrenal activity and psychosocial stress. The significance of aging, long-term smoking, and stress models. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Dec 29;771:640-7). Pleil KE, Lowery-Gionta EG, Crowley NA, Li C, Marcinkiewicz CA, Rose JH, McCall

43. NM, Maldonado-Devincci AM, Morrow AL, Jones SR, Kash TL. Effects of chronic ethanol exposure on neuronal function in the prefrontal cortex and extended amygdala. *Neuropharmacology*. 2015 Dec;99:735-49.
44. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck* 1996; 18(5):441-9.
45. MacDonald DG. Comparison of epithelial dysplasia in hamster cheek pouch carcinogenesis and human oral mucosa. *J Oral Pathol* 1981; 10(3):186-91.
46. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia: the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 24: 53-8.
47. Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol*. 2005; 41(4):337-9.
48. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:301-134.
49. Urban R, Scherrer G, Goulding EH, Tecott LH, Basbaum AI: Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain* 2011; 152:990-1000.
50. LASKEY AM. Acid thionin stain for Nissl bodies on frozen sections. *Stain Technol*. 1949 Jul;24(3):143.
51. Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med*. 1991; 20(8):369-72.
52. Katz HC, Shear M, Altini M. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. *J Oral Pathol* 1985; 14(6):476-82.
53. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 1991 Dec;231(4):482-97.
54. Cohen L, de Moor C, Devine D, Baum A, Amato RJ. Endocrine levels at the start of treatment are associated with subsequent psychological adjustment in cancer patients with metastatic disease. *Psychosom Med*. 2001; 63(6):951±8.
55. Lutgendorf SK, Andersen BL. Biobehavioral Approaches to cancer progression and survival: mechanisms and interventions. *Am Psychol*. 2015; 70(2):186±197.
56. Ates O, Soylu C, Babacan T, Sarici F, Kertmen N, Allen D, et al. Assessment of psychosocial factors and distress in women having adjuvant endocrine therapy for

breast cancer: the relationship among emotional distress and patient and treatment-related factors. SpringerPlus. 2016; 5:486.

57. Bastos DB, Sarafim-Silva BAM, Sundefeld MLMM, Ribeiro AA, Brandão JDP, Biasoli ÉR, Miyahara GI, Casarini DE, Bernabé DG. Circulating catecholamines are associated with biobehavioral factors and anxiety symptoms in head and neck cancer patients. PLoS One. 2018 Aug 20;13(8): e0202515.
58. Valente VB, Verza FA, Lopes FYK, Ferreira JZ, Dos Santos PSP, Sundefeld MLMM, Biasoli ÉR, Miyahara GI, Soubhia AMP, de Andrade M, de Oliveira SHP, Bernabé DG. Stress hormones concentrations in the normal microenvironment predict risk for chemically induced cancer in rats.
59. Ribeiro DA, Favero Salvadori DM, da Silva RN, Ribeiro Darros B, Alencar Marques ME. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Oral Oncol. 2004 Oct;40(9):9105.
60. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. Oral Oncol. 2006 Aug;42(7):655-67. Epub 2006 Jan 30. Review.
61. Thornton LM, Andersen BL, Blakely WP. The pain, depression, and fatigue symptom cluster in advanced breast cancer: covariation with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system. Health Psychol. 2010 May;29(3):333-7.
62. Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. Neuropsychopharmacology 1998;18:135–74.
63. Taylor AE, Fluharty ME, Bjørngaard JH, Gabrielsen ME, Skorpen F, Marioni RE, Campbell A, Engmann J, Mirza SS, Loukola A, Laatikainen T, Partonen T, Kaakinen M, Ducci F, Cavadino A, Husemoen LL, Ahluwalia TS, Jacobsen RK, Skaaby T, Ebstrup JF, Mortensen EL, Minica CC, Vink JM, Willemsen G, Marques-Vidal P, Dale CE, Amuzu A, Lennon LT, Lahti J, Palotie A, Rääkkönen K, Wong A, Paternoster L, Wong AP, Horwood LJ, Murphy M, Johnstone EC, Kennedy MA, Pausova Z, Paus T, Ben-Shlomo Y, Nohr EA, Kuh D, Kivimaki M, Eriksson JG, Morris RW, Casas JP, Preisig M, Boomsma DI, Linneberg A, Power C, Hyppönen E, Veijola J, Jarvelin MR, Korhonen T, Tiemeier H, Kumari M, Porteous DJ, Hayward C, Romundstad PR, Smith GD, Munafò MR. Investigating the possible causal association of smoking with depression and anxiety using Mendelian randomisation meta-analysis: the CARTA consortium. BMJ Open. 2014 Oct 7;4(10):e006141
64. File SE, Cheeta S, Kenny PJ. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. Eur J Pharmacol. 2000 Mar 30;393(1-3):231-6.
65. Effects of chronic ethanol exposure on neuronal function in the prefrontal cortex and extended amygdala Kristen E. Pleil, Emily G. Lowery-Gionta, Nicole A.

- Crowley, Chia Li, Catherine A. Marcinkiewicz, Jamie H. Rose, Nora M. McCall, Antoniette M. Maldonado-Devincci, A. Leslie Morrow, Sara R. Jones, Thomas L. Kash Neuropharmacology. Author manuscript; available in PMC 2016 Dec 1. Published in final edited form as: Neuropharmacology. 2015 Dec; 99: 735–749.
66. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications Lívea Dornela Godoy, Matheus Teixeira Rossignoli, Polianna Delfino-Pereira, Norberto Garcia-Cairasco, Eduardo Henrique de Lima Umeoka Front Behav Neurosci. 2018; 12: 127.
67. Asan E, Steinke M, Lesch KP. Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. Histochem Cell Biol. 2013 Jun;139(6):785-813.
68. Ashokan A, Hegde A, Mitra R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala.
69. Welsch CW, Clemens JA, Meites J. Effects of hypothalamic and amygdaloid lesions on development and growth of carcinogen-induced mammary tumors in the female rat. Cancer Res. 1969 Aug;29(8):1541-9.
70. Matsuoka Y, Yamawaki S, Inagaki M, Akechi T, Uchitomi Y. A volumetric study of amygdala in cancer survivors with intrusive recollections. Biol Psychiatry. 2003 Oct 1;54(7):736-43.

## Anexo

### Parecer do CEUA (FOA-UNESP)



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



FLS. 09  
PROG. 495/16  
RUB. [assinatura]

**CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise da influência do estresse precoce de vida sobre a carcinogênese bucal: estudo histopatológico, molecular e comportamental em animais"**, Processo FOA nº 00495-2016, sob responsabilidade de Daniel Galera Bernabé apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2016.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 02 de Outubro de 2018.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 02 de Novembro de 2018.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of early life stress on oral carcinogenesis: histopathology, molecular and behavioral studies in animals"**, Protocol FOA nº 00495-2016, under the supervision of Daniel Galera Bernabé presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2016.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** October 02, 2018.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** November 02, 2018.

*[Assinatura]*  
**Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Lafanjeira**  
Coordenadora da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA - SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br