



Heitor Pinhata Cecilio

**Inibição beta-adrenérgica reduz a incidência e o
crescimento do carcinoma espinocelular de boca
induzido por 4NQO em ratos**

Araçatuba-SP

2017

Heitor Pinhata Cecilio

**Inibição beta-adrenérgica reduz a incidência e o
crescimento do carcinoma espinocelular de boca
induzido por 4NQO em ratos**

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé

Araçatuba-SP

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Rozemeire Terezinha Pinhata Moraes, Ledo Cecilio, às minhas tias Marcia Cristina Pinhata e Rosana de Fátima Pinhata, e à minha avó, Maria Cleusa Montovanelli Pinhata,

Que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha jornada acadêmica. Agradeço por acreditarem no meu sonho e por permitir que ele se tornasse realidade, sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Afonso Castro, Leonardo Raniel e Matheus Gomes,

Mais que amigos, foram irmãos com quem pude viver muitos momentos durante a graduação. Não consigo imaginar como teriam sido esses cinco anos sem a amizade e o companheirismo de vocês, que levarei para sempre comigo. Obrigado por cada instante que passamos juntos. A república Full House foi uma das melhores experiências que tive na vida e lembrarei com carinho de cada detalhe que ficará para sempre em minha memória.

A minha namorada Rafaela,

Tenho muita sorte em ter você como companheira, você é uma pessoa que me inspira ser um sujeito melhor. Agradeço por todo o amor, carinho e paciência que esbanja para me ajudar a cumprir as tarefas do dia a dia.

A Surubateria,

Pela oportunidade de construir laços fortes, como companheiros de equipe e também como amigos, que me fizeram crescer e descontraír em momentos de tensão, e que me ensinaram muito mais do que eu poderia imaginar nesses quatro anos que fiz parte da instituição.

Ao grupo PET Odonto FOA,

Na pessoa do Prof. Dr. Eloi Dezan, que sempre visou a melhor performance do grupo que o tem como tutor. A cada companheiro que tive o prazer de compartilhar eventos e reuniões durante estes 3 anos de projeto, vocês me proporcionaram um grande crescimento pessoal.

Ao Diretório Acadêmico Carlos Aldrovandi,

A maior honra da minha vida foi presidir um órgão de tamanha representatividade na faculdade em que escolhi cursar. Foram momentos e amizades cultivadas que levarei para o resto dos meus dias.

Aos meus companheiros de iniciação científica Felipe Yudi, Lia Kobayashi, Flavia Verza, Giseli Mitsui, Karla Zancan Pereira, Jéssica Figueira, Vitor Bonetti Valente, Saygo Tomo, Daniela Bastos, Ingrid Faria, Bruna, Saygo Tomo

A meus amigos Allan Oliveira, Amanda Valente, Ana Beatriz Repizo, Anna Clara Mendes, Arthur Lacerda, Cassio Sversut, Denis Watanabe, Diego Sakaguchi, Felipe Yudi, Francienne Castro, Gabriel Maranhã, Gabriel Minatogawa, Gabriel Nunes, Jaqueline Nakao, Jesse Augusto, Jéssica Cordeiro, Jéssica Galbiati, José Carlos Saliba, , Juliana Nobre, Laryssa Castro, Letícia Gonçalves, Lourenço Canevari, Luana Gonçalves, Lucas Amantéa, Luis Felipe Pupim, Marília Bérghamo, Matheus Sampaio, Maurício Akama, Moacir Rossini Neto, Murilo Cestari, Murilo Oliveira, Pedro Henrique Chaves, Ricardo Souza, Rodrigo Cosin, Rogério Vidal Júnior, Ronaldo Júnior, Thainan Véscio, Vinícius Oliveira, Vitor Shimada, Willian Jacometo, e a todos que estiveram comigo nesses anos,

Só tenho a agradecer, ver o tamanho da lista e ainda saber que existem outros mais a serem lembrados me deixa muito feliz por ter construído esses laços. Foram tantos momentos e histórias que seria impossível citar aqui. Mas, deixo meu muito obrigado a todos vocês por terem feito desse meu período na faculdade os melhores anos da minha vida.

Ao meu professor orientador Daniel Galera Bernabé,

Obrigado por confiar em mim, pelos ensinamentos que me foi passado, e pela oportunidade de poder aprender com você na clínica e nas salas de aula. Com certeza foi um professor marcante na minha graduação, e tenho certeza de que a disciplina de Estomatologia da FOA-UNESP está muito bem representada com seus ensinamentos.

A professora Sandra Helena Penha de Oliveira,

Obrigado pelos ensinamentos, por estar sempre à disposição para me ajudar, pela paciência, pelos puxões de orelha em sua disciplina, pela oportunidade e por toda dedicação. Tenho muita admiração por você, tanto no pessoal quanto no profissional, é uma pessoa diferenciada que tive a honra de conhecer.

Ao mestre Vitor Bonetti Valente,

Obrigado pela paciência e entusiasmo que trata todos à sua volta. Dá para notar de longe que você é uma pessoa diferenciada. Tenho certeza que com o trabalho e os métodos que utiliza seu sucesso é uma realidade.

A turma LIX de Odontologia,

Obrigado pelo companheirismo nessa longa jornada acadêmica, pelos amigos que fiz e pela união. Vou levar comigo lembranças de todos vocês que foram como uma segunda família para mim. Vou sentir saudades.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

Aos Pacientes,

Agradeço por depositarem tanta confiança em meu trabalho mesmo sabendo de nossa inexperiência, sempre dispostos a colaborar e pacientes conosco, graças a vocês adquirimos experiências e sabedoria não só pela parte prática da odontologia, mas também a como lidar com o ser humano. A nossa maior satisfação está quando terminamos um trabalho e olhamos para o paciente e ele apresenta um sorriso aberto

e feliz pelo resultado. Vocês foram fundamentais para que hoje tornássemos cirurgiões-dentistas. Muito obrigado.

A todos os professores pelos ensinamentos que foram ministrados e pela dedicação, contribuindo para minha formação profissional.

E a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão.

EPÍGRAFE

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.” Dalai Lama

Cecilio, HP. Inibição da sinalização beta-adrenérgica reduz a incidência e o crescimento do carcinoma espinocelular de boca induzido por 4NQO em ratos. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Estudos têm mostrado a participação dos receptores beta-adrenérgicos na progressão de diversos tipos de câncer. Entretanto, inexitem estudos que avaliaram a participação destes receptores no processo de carcinogênese bucal em modelos pré-clínicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inibição beta-adrenérgica sobre a incidência e progressão do carcinoma espinocelular (CEC) de boca induzido pelo carcinógeno químico 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) em ratos. Foram utilizados 64 ratos machos Wistar divididos em dois grupos. Grupo Propranolol: 32 animais tratados com o antagonista beta-adrenérgico propranolol (10 mg/kg diluído em PBS, via subcutânea). Grupo Sham (controle): 32 animais tratados com o veículo PBS (via subcutânea). Os animais de ambos os grupos foram submetidos por 16 semanas ao modelo de carcinogênese bucal induzida por 4NQO quando então foram eutanasiados para avaliação histopatológica da ocorrência de CEC em dorso de língua. Os resultados mostraram que os ratos tratados com Propranolol tiveram menor incidência e espessura de CEC de boca quimicamente induzido do que os animais do grupo controle. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os dois grupos quanto às análises do volume tumoral e do grau de malignidade das lesões tumorais. A inibição beta-adrenérgica pode reduzir a incidência do câncer de boca quimicamente induzido em modelos pré-clínicos.

Palavras-chave: Câncer, Câncer de boca, Carcinogênese, Propranolol, Antagonistas Adrenérgicos, Receptores adrenérgicos

Cecilio, HP. Beta-adrenergic blockade reduces oral squamous cell carcinoma incidence and progression in rats. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Recent studies have shown that beta-adrenergic receptors activation can influence cancer progression. However, there are no studies which have investigated the role of beta-adrenergic receptors on the oral carcinogenesis in preclinical models. The main goal of this study was to evaluate the effects of beta-adrenergic inhibition on the chemically induced oral carcinogenesis in rats. Sixty-four male Wistar rats were divided into two groups: Propranolol group: The animals were treated with a beta-adrenergic antagonist propranolol (10mg/kg diluted in PBS via subcutaneous); Control group (Sham): The animals were treated subcutaneously with vehicle alone (PBS). Both groups were submitted to an oral carcinogenesis model by the treatment with carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) diluted in drinking water for 16 weeks. After 16 weeks of carcinogenic induction, the animals were euthanized and the tongue was removed. Histopathological examination was performed to evaluate the presence and extension of tongue squamous cell carcinomas (SCCs). Specific statistical tests were performed to evaluate the differences in the cancer incidence and progression between the two experimental groups. Our results showed that rats in the Propranolol Group had a lower tumor incidence and thickness when compared to the control group. However, our tests did not show significant differences between tumor volume and degree of malignancy when the groups were compared. Knowing that, the beta-adrenergic signaling blockade may reduce cancer incidence and thickness on a preclinical model.

Keywords: Cancer, Oral Cancer, Carcinogenesis, Propranolol, Adrenergic Antagonists, Adrenergic Receptors

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caraterísticas microscópicas dos CECs de acordo com os critérios de Bryne ⁵⁰ .	27
Tabela 2	Risco de malignização das leucoplasias de acordo com o Sistema Binário de Kujan et al ⁵¹ .	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características clínicas e histopatológicas do CEC quimicamente induzido	22
Figura 2	Incidência de leucoplasia e CEC de boca	23
Figura 3	Espessura e volume tumoral	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Carcinoma Espinocelular (CEC).

Sistema Nervoso Simpático (SNS).

AMP cíclico (AMPC).

4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO).

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Partículas por molécula (PPM).

Hematoxilina e Eosina (H&E).

Espécies de oxigênio reativas (EROS).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

SUMÁRIO

1. Introdução.....	Erro! Indicador não definido.5
2. Objetivo	17
3. Materiais e métodos	18
3.1 Animais e condições experimentais.....	Erro! Indicador não definido.18
3.2 Delineamento experimental.....	Erro! Indicador não definido.8
3.3 Tratamento com propranolol.....	Erro! Indicador não definido.18
3.4 Administração do carcinógeno 4NQO.....	Erro! Indicador não definido.19
3.5 Análise histopatológica	19
3.6 Espessura e volume tumoral.....	20
3.7. Análise estatística	20
4. Resultados	21
5. Discussão	28
6. Conclusão.....	31
7. Referências.....	32
8.Anexos.....	35

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que no mundo em 2020, 15 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer¹ sendo que cerca de 60% dos casos ocorrerão em países em desenvolvimento como o Brasil.² O uso crônico do tabaco e o consumo excessivo do álcool se configuram como fortes fatores de risco para alguns dos principais tipos de câncer.¹ O câncer de boca é o tipo mais prevalente entre os tumores de cabeça e pescoço e o sexto tipo de câncer mais comum em incidência global, representando cerca de 4% dos tumores malignos em todo o mundo.¹ Em 2016, foram estimados no Brasil 11.140 novos casos de câncer de boca em homens e 4.350 em mulheres.² Mais de 90% dos cânceres de boca são do tipo Carcinoma Espinocelular (CEC).² Mais da metade dos portadores de CEC de boca apresentam metástases regionais ou distantes no momento do diagnóstico, o que determina um alto índice de mortalidade e morbidade à doença.^{3,4}

Recentemente, um conjunto crescente de evidências têm indicado que mediadores relacionados ao estresse emocional podem influenciar a progressão de neoplasias malignas.⁵ Uma das principais vias que vem sendo estudada por mediar os efeitos do estresse emocional sobre o câncer é o Sistema Nervoso Simpático (SNS).⁶ A ativação do SNS durante o estresse crônico pode induzir uma produção desregulada de catecolaminas como a norepinefrina e a epinefrina pelo Sistema Nervoso Central e pelas glândulas adrenais.⁷ Os receptores adrenérgicos são receptores extracelulares presentes na membrana celular que, uma vez ativados por moléculas agonistas, como as catecolaminas, medeiam as ações do SNS.⁷ As fibras do SNS inervam a grande maioria dos órgãos e em resposta a estímulos fisiológicos, psicológicos e ambientais são capazes de produzir e liberar maiores concentrações de norepinefrina no tecido alvo.⁷ Foram descritos 5 subtipos de receptores ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$), que estão acoplados à proteína G e sua ativação inicia um processo de sinalização intracelular, com modulação dos níveis de AMP cíclico (AMPc).⁸ Os receptores beta-adrenérgicos têm sido profundamente estudados e podem ser encontrados em sítios de crescimento tumoral e metástases de diversos tipos de câncer.⁹

A participação dos receptores beta-adrenérgicos sobre a progressão de tumores malignos vem sendo alvo de vários estudos.⁹⁻¹¹ A ativação do SNS pode elevar os níveis de norepinefrina aumentando a proliferação celular e o crescimento de diversos tipos de câncer e estes efeitos podem ser inibidos por drogas beta-bloqueadoras¹²⁻¹⁸. Estudo de nossa equipe demonstrou que o tratamento prévio com propranolol (betabloqueador inespecífico) inibiu a proliferação de células do CEC de boca após estímulo com a norepinefrina.¹⁹ A hiperativação dos receptores beta-adrenérgicos pode alterar também a produção de diversas moléculas associadas à progressão do câncer.²⁰⁻²² O bloqueio beta-adrenérgico está associado, por exemplo, à inibição de mediadores relacionados à angiogênese (ex. VEGF²⁰⁻²³ e TGF-beta^{24,25}), invasão celular (ex. MMP-2 e MMP-9^{29,30}) e evasão à apoptose de células tumorais.^{26,31-33} A produção destas moléculas pode estar relacionada à exposição de alguns carcinógenos químicos e, podem ser inibidas pela administração de um beta-bloqueador.³⁵⁻³⁷ Alguns estudos clínicos têm mostrado que a utilização de beta-bloqueadores como anti-hipertensivos pode prevenir o câncer de próstata³⁸ e reduzir as taxas de metástase e recorrência de tumores malignos de mama.³⁹ Em um estudo pré-clínico⁴¹, o aumento da incidência de tumores pulmonares quimicamente induzidos provocado pela exposição crônica às catecolaminas foi inibido pelo tratamento com propranolol.

Apesar das evidências relatadas anteriormente de que os receptores beta-adrenérgicos podem mediar a progressão de alguns tipos de câncer e que a inibição beta-adrenérgica pode influenciar *in vitro* a proliferação das células do CEC de boca, ainda não há estudos que avaliaram a participação dos receptores beta-adrenérgicos sobre o processo de carcinogênese bucal em modelos *in vivo*. Sendo assim, neste estudo, nós avaliamos os efeitos do beta-bloqueador propranolol sobre a carcinogênese bucal induzida quimicamente.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inibição da sinalização beta-adrenérgica sobre a incidência e progressão do carcinoma espinocelular (CEC) de boca induzido pelo carcinógeno químico 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) em ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e condições experimentais

Todos os experimentos envolvendo os animais foram desenvolvidos de acordo com o Guia de Princípios para Uso de Animais de Laboratório e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (Anexo A). Foram utilizados 64 ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 300 g, que foram mantidos (4 animais por caixa) no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, SP, Brasil. 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).

3.2. Delineamento experimental

Para avaliar se o bloqueio da sinalização beta-adrenérgica influencia a carcinogênese bucal induzida por 4NQO, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Grupo Propranolol: 32 ratos machos Wistar tratados com propranolol, por via subcutânea. Grupo Sham (controle): 32 ratos machos Wistar tratados com solução de PBS 1X, por via subcutânea.

3.3. Tratamento com propranolol

Os animais do grupo Propranolol foram submetidos diariamente à injeção (via subcutânea) com solução de propranolol (10 mg/kg diluído em PBS 1X)⁴⁵ manipulado em farmácia credenciada pelo Conselho Regional de Farmacologia e fiscalizada pela ANVISA. O tratamento com o fármaco foi iniciado uma semana antes do início da indução carcinogênica. Os animais foram pesados semanalmente para controle da dose administrada. Os mesmos métodos foram utilizados para o grupo controle Sham, que foi tratado com solução de PBS 1X no mesmo volume das injeções de propranolol.

3.4. Administração do carcinógeno 4NQO

Tanto os animais do grupo Propranolol, quanto os animais do grupo controle (Sham) foram submetidos ao modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida por meio da administração crônica do carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO). Estudos mostram^{47,48} que este modelo de carcinogênese química promove em ratos o desenvolvimento do CEC de língua com alterações moleculares e teciduais próximas àquelas que ocorrem no CEC de boca em humanos. Para a indução carcinogênica, os animais foram tratados com 50 partículas por molécula (ppm) de 4NQO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluídos 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. Os animais foram eutanasiados por decapitação após 16 semanas de indução carcinogênica. Este período foi definido com base em estudos prévios^{47,48} e nossa experiência com este modelo de carcinogênese bucal.

3.5. Análise histopatológica

As línguas dos animais foram seccionadas longitudinalmente para realização da análise histopatológica. Estes tecidos foram fixados em formaldeído tamponado à 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 48h, embebidos em parafina, seccionados à 4 µm e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E, Merck). As lesões linguais derivadas do tratamento com 4NQO foram classificadas em leucoplasia bucal e carcinoma espi-nocelular (CEC). A leucoplasia bucal é considerada uma lesão cancerizável precursora do CEC. Para o diagnóstico de leucoplasia, a ocorrência das características microscópicas atrofia do epitélio, hiperplasia com ou sem hiperqueratose e displasia epitelial foi observada. O grau de displasia epitelial foi classificado em leve, moderado ou severo.⁴⁹ O grau histológico de malignidade dos CECs foi determinado de acordo com os critérios de Bryne⁵⁰ (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório). O risco à

malignidade dos espécimes de leucoplasia bucal foi definido de acordo com os critérios de Kujan et al⁵¹.

3.6. Espessura e volume tumoral

Para medir a espessura tumoral, imagens microscópicas dos cortes histológicos dos CECs foram capturadas em um microscópio específico acoplado a uma câmera digital (DM400B Leica, Wetzlar, Germany). A medida foi realizada a partir do ponto mais profundo de invasão tumoral até a superfície da úlcera ou do epitélio e foi obtida em micrômetros (μm) utilizando o software Qwin Plus® (Leica Microsyste, Cambridge, UK). Após a eutanásia, as três medidas dimensionais da lesão tumoral (invasão, largura e espessura) foram obtidas por meio de uma régua. O volume tumoral foi obtido em milímetros cúbicos (mm^3) por meio da seguinte fórmula: volume = invasão x largura x espessura.

3.7. Análise estatística

O teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar se houveram diferenças na incidência de CEC de boca e no grau histológico das lesões tumorais e leucoplásicas entre os grupos estudados. O Teste t de Student foi utilizado para avaliar se os CECs dos ratos tratados com propranolol e veículo diferiram em espessura e volume. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir a diferença de valores como estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Bloqueio beta-adrenérgico reduz a incidência de CEC de boca induzido quimicamente

Primeiro, investigamos o efeito do bloqueio beta-adrenérgico sobre a incidência de CEC de boca induzido por 4NQO. Após 20 semanas de indução carcinogênica, no grupo de animais tratados com propranolol, apenas 9 ratos (31%) desenvolveram CEC de boca e 20 ratos (69%) leucoplasia bucal (Figs. 1C e D). No grupo controle (Sham), 13 animais (52%) desenvolveram CEC de boca enquanto 12 animais (48%) leucoplasia bucal (Fig. 1A e B). O tratamento com propranolol reduziu em aproximadamente 40% a incidência de CEC de boca quando comparado ao grupo Sham (Fig. 2; $p=0.0499$).

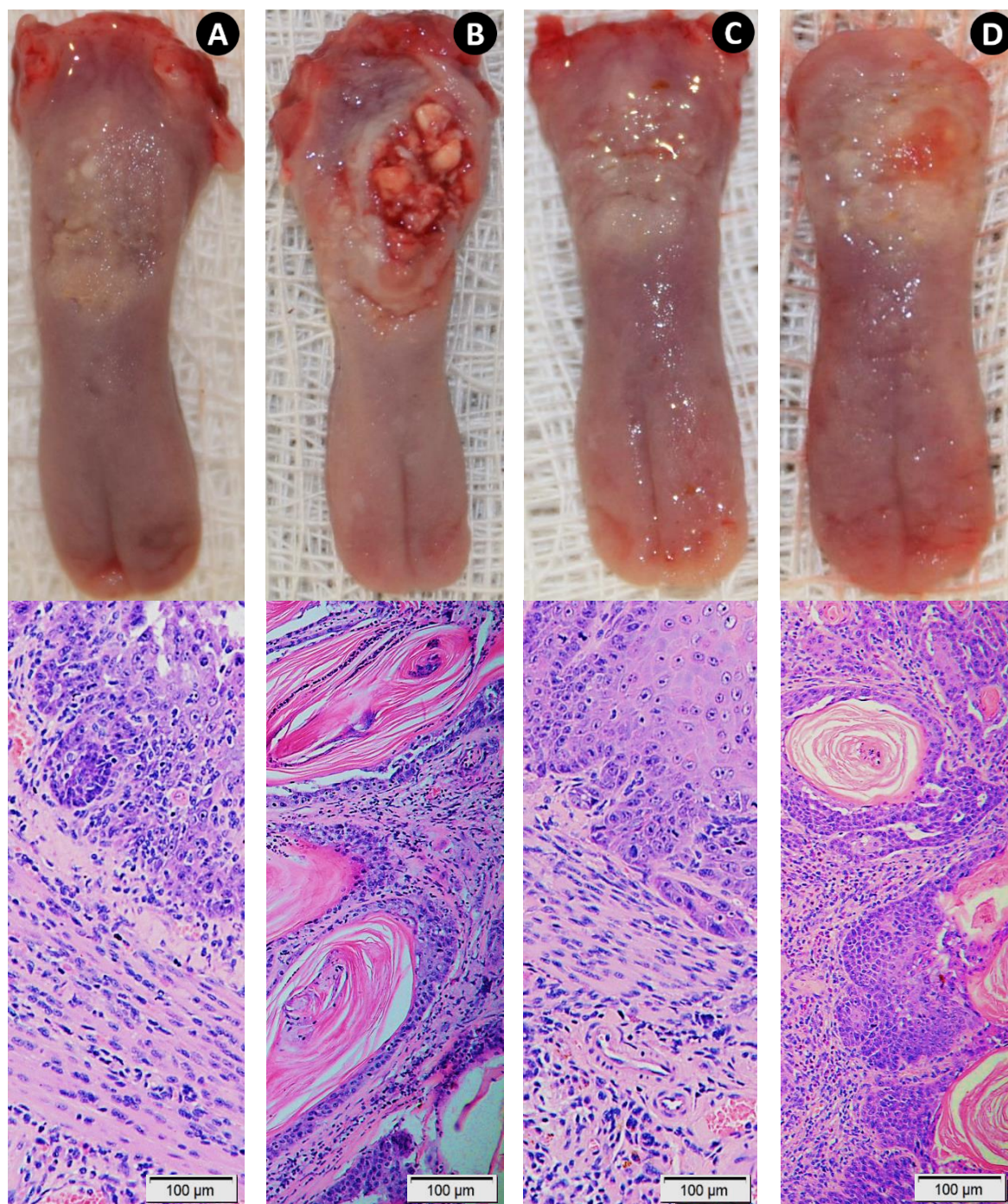


Fig. 1. Características clínicas do CEC quimicamente induzido (ratos do grupo Sham, A e B vs ratos tratados com propranolol, C e D). (A) Placa branca com áreas irregulares. (B) Úlcera nodular extensa. (C) Placa branca com áreas erosivas. (D) Placa branca com pequena úlcera. **Características histopatológicas das lesões tumorais (colocação H&E).** O exame histopatológico revelou CECs microinvasivos (A e C) e CECs invasivos (B, D) com células bem diferenciadas organizadas em ilhas de tamanhos variáveis. Nos CECs invasivos, a presença de pérolas de queratina e infiltrado inflamatório crônico no estroma do tumor também podem ser observados.

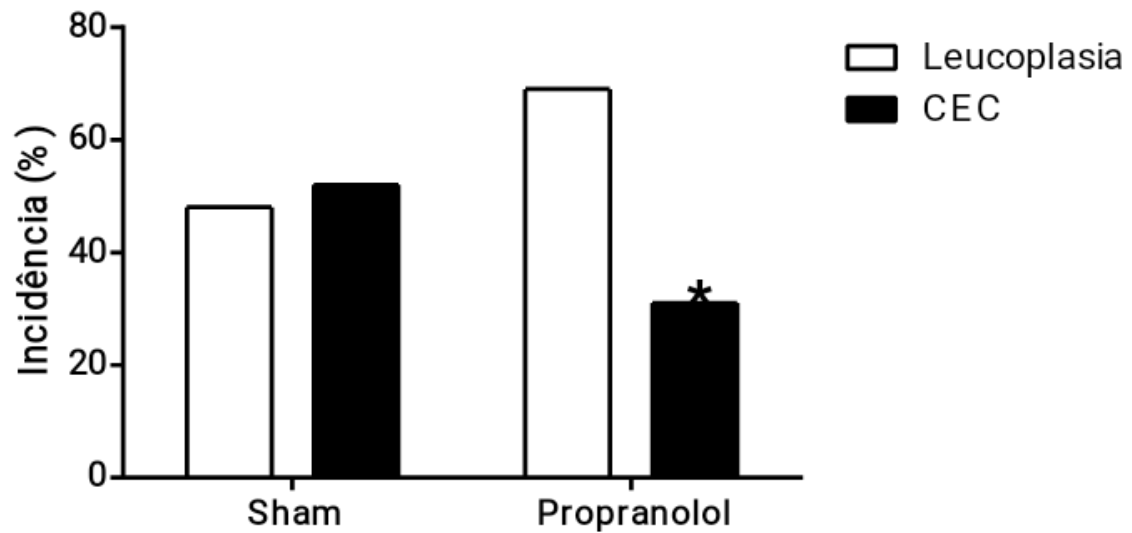


Fig.2. Incidência de leucoplasia e CEC de boca. Animais submetidos ao bloqueio beta-adrenérgico com propranolol tiveram menor incidência de CEC quando comparados aos ratos não tratados com o beta-bloqueador (grupo Sham) (Qui-quadrado; * $p=0.0499$).

4.2. Propranolol inibiu o crescimento do CEC de boca induzido quimicamente

Nossos resultados mostraram que os ratos tratados com propranolol desenvolveram CEC de boca induzido quimicamente com menor espessura ($1454 \pm 137.5 \mu\text{m}$) quando comparados aos tumores dos animais do grupo controle ($2139 \pm 233 \mu\text{m}$). Os ratos do grupo Propranolol exibiram CECs com espessura de cerca de 1.5 vez menor que os tumores dos animais do grupo Sham ($p=0.0392$; Fig. 3A). Embora os animais do grupo Propranolol também tenham mostrado um volume tumoral de cerca de 1.5 vez menor que os CECs do grupo Sham, este resultado não atingiu significância estatística ($p=0.3904$; Fig. 3B).

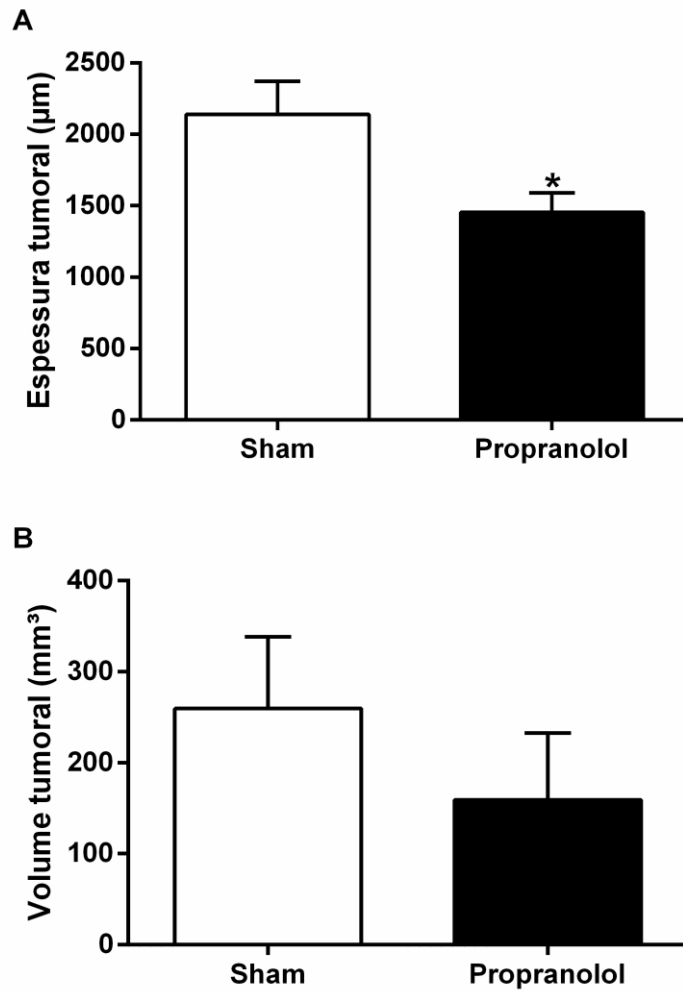


Fig.3. Espessura e volume tumoral. Ratos tratados com o antagonista beta-adrenérgico propranolol desenvolveram tumores com menor espessura que os CECs dos ratos do grupo controle (Teste t de student; $p=0.0392$). Porém, este resultado não foi significativo para a análise do volume tumoral (Teste t de Student; $p=0.3904$).

4.3. Efeitos do bloqueio beta-adrenérgico sobre as características microscópicas de malignidade do CEC de boca induzido quimicamente

De acordo com a OMS⁴⁹, em ambos os grupos, a maioria dos CECs mostrou-se bem diferenciado (Sham, 90% vs Propranolol, 87%). Os tumores do grupo Propranolol apresentaram menor grau de queratinização que os tumores do grupo controle (Sham, 80% vs Propranolol, 14%; $p=0.0468$) e, para ambos os grupos, a maioria dos CECs apresentou grau moderado de pleomorfismo nuclear (Sham, 66% vs Propranolol, 58%; $p=0.9266$) e do infiltrado inflamatório subjacente ao tumor (Sham, 67% vs Propranolol, 72%; $p=0.8385$). Embora os tumores do grupo Sham tenham mostrado um padrão de invasão predominantemente infiltrante (Sham, 90% vs Propranolol, 43%; $p=0.0995$), este resultado não foi significativo. De acordo com os critérios de Bryne⁵⁰, também não houve diferença significativa entre os grupos Sham e Propranolol quanto ao grau de agressividade dos CECs ($p=0.1148$; Tabela 1). Nos animais que desenvolveram leucoplasia bucal, em ambos os grupos, os espécimes foram identificados em sua maioria com displasia epitelial moderada (Sham, 66% vs Propranolol, 82%) e com baixo risco à malignização ($p=0.5900$; Tabela 2).

Tabela 1. Características microscópicas dos CECs de acordo com os critérios de Bryne⁵⁰.

Variáveis	Sham	Propranolol	Valor de p
Grau de queratinização			
Alto	8 (80%)	1 (14%)	0.0468*
Moderado	1 (10%)	4 (58%)	
Mínimo	1 (10%)	1 (14%)	
Nenhum	0 (0%)	1 (14%)	
Pleomorfismo nuclear			
Baixo	2 (22%)	2 (29%)	0.9266
Moderado	6 (66%)	4 (57%)	
Abundante	1 (12%)	1 (14%)	
Extremo	0 (0%)	0 (0%)	
Padrão de invasão			
Bem delineado	0 (0%)	1 (14%)	0.0995
Infiltrante	9 (90%)	3 (43%)	
Em pequenos grupos	1 (10%)	3 (43%)	
Marcado	0 (0%)	0 (0%)	
Infiltrado inflamatório			
Intenso	3 (33%)	2 (28%)	0.8385
Moderado	6 (67%)	5 (72%)	
Leve	0 (0%)	0 (0%)	
Nenhum	0 (0%)	0 (0%)	
Agressividade			
Baixa	8 (80%)	3 (42%)	0.1148
Alta	2 (20%)	4 (58%)	

Qui-quadrado; *valor considerado significativo com $p < 0.05$.

Tabela 2. Risco de malignização das leucoplasias de acordo com o Sistema Binário de Kujan et al⁵¹.

Grupos	Alto risco	Baixo risco	Valor de p
Sham	1 (10%)	10 (90%)	0.5900
Propranolol	2 (17%)	10 (83%)	

Qui-quadrado.

5. DISCUSSÃO

Há algum tempo, estudos têm especulado que a ativação da sinalização beta-adrenérgica poderia influenciar o início e a progressão do câncer. Estudos clínicos, por exemplo, têm associado o uso dos beta-bloqueadores diminuição da ocorrência de alguns tipos de tumores malignos.^{38,40} Perron et al.³⁸ demonstraram que estes fármacos podem reduzir as taxas de incidência do câncer de próstata, por exemplo. Em outro estudo prospectivo, dos 839 pacientes cardiopatas que faziam uso de pelo menos um tipo de beta-bloqueador como medicação anti-hipertensiva, apenas 15 indivíduos desenvolveram algum tipo de câncer depois de 10 anos.⁴⁰ Estes eventos indicam que o bloqueio beta-adrenérgico pode desempenhar um papel importante e significativo para a prevenção do câncer em seres humanos. Em modelos animais, são escassos os estudos que têm demonstrado que a carcinogênese quimicamente induzida poderia ser inibida pelo uso crônico dos beta-bloqueadores.^{41,51} Huang et al.⁵¹ observaram que o carcinogênese cutânea em camundongos foi reduzida pela administração de carvedilol, um beta-bloqueador não-seletivo como o propranolol. Em hamsters, outro estudo demonstrou que o aumento da incidência de câncer de pulmão quimicamente induzido provocado pela injeção subcutânea de agonistas beta-adrenérgicos (epinefrina e teofilina) foi inibido pelo tratamento com propranolol.⁴¹ Pelo nosso conhecimento, até o momento não haviam estudos que tivessem avaliado os efeitos do bloqueio beta-adrenérgico sobre o processo de carcinogênese bucal induzida em modelos pré-clínicos. Os resultados do nosso estudo mostraram

que o bloqueio beta-adrenérgico não-seletivo pela administração crônica de propranolol concomitantemente à indução carcinogênica quimicamente induzida reduziu em cerca de 40% a incidência do CEC de boca em ratos e diminuiu consideravelmente o crescimento dos tumores

Os mecanismos pelos quais o bloqueio da sinalização beta-adrenérgica atua reduzindo o processo de iniciação do câncer vem sendo alvo de alguns estudos recentes.⁵⁵⁻⁵⁷ Sabe-se que um dos principais pilares para a ocorrência da carcinogênese é a presença de danos no DNA e a supressão dos mecanismos de seu reparo, eventos moleculares que podem acontecer após ativação da sinalização beta-adrenérgica pelas catecolaminas⁵⁵⁻⁵⁷, por exemplo. Flint et al.⁵⁷ mostraram que o estímulo beta-adrenérgico com norepinefrina e epinefrina induziu danos significativos no DNA de fibroblastos de camundongos e este efeito foi bloqueado nas células previamente tratadas com propranolol. Recentemente, Hara et al. mostraram que o estresse crônico pode promover a ativação da sinalização beta-adrenérgica e induzir vias intracelulares importantes, como a cAMP/PKA através da enzima adenilil ciclase, que resulta no acúmulo de espécies de oxigênio reativas (EROS) capazes de danificar fitas de DNA, levando ao processo de tumorigênese. Em estudo de outra via, Hara descreveu que a beta-arrestina1, molécula ativada após sensibilização dos receptores beta-adrenérgicos tipo 2, facilita a ativação de MDM2 mediada por AKT e funciona como ponte para promover a ligação e degradação do p53, uma proteína de supressão tumoral.⁵⁵ Por serem vias engatilhadas pela ativação do sistema beta-adrenérgico, acreditamos que estes eventos possam explicar os mecanismos moleculares da carcinogênese bucal induzida quimicamente.

Além da relação entre o sistema beta-adrenérgico e o processo de tumorigênese, muitos estudos visam estudar o papel dos beta-bloqueadores na progressão dos tumores malignos. Em nossos resultados, observamos uma significativa redução na espessura dos tumores em animais tratados com propranolol quando comparado ao controle. A espessura tumoral representa a invasão que o tumor atinge no estroma e está associada aos fatores de progressão tumoral. Estudo de nosso laboratório mostrou que o bloqueio beta-adrenérgico com propranolol inibiu a proliferação *in vitro* das células de CEC de boca humano. Como mesmo foi observado por Pham et al.³⁵, em células de câncer pancreático humano. Os autores também observaram o propranolol inibiu a migração das duas linhagens de células de câncer utilizadas no estudo.³⁵ A ação inibitória da proliferação tumoral realizada pelos beta-bloqueadores é também observada em estudos, mama¹³, ovário^{14,15}, esôfago¹⁶ e pulmão^{17,18}.

Fatores como angiogênese tumoral e evasão à apoptose também estão associados ao aumento da espessura tumoral. Para que um tumor se torne mais espesso, ele deve possuir um aporte sanguíneo que seja suficiente para a sobrevivência das células, além de evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro que induzem apoptose celular. A superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no tecido neoplásico está associada à indução de angiogênese tumoral^{20,23}, e receptores beta-adrenérgicos podem modular a expressão de VEGF após estímulo com norepinefrina em células tumorais de nasofaringe²¹ e esôfago²². Estes efeitos são anulados pela administração dos beta-bloqueadores propranolol e atenolol. Patercke et al. mostraram que células humanas de câncer de próstata produziram níveis elevados de TGF-beta (outra citocina pró-angiogênica tumoral) quando enxertadas em camundongos atímicos expostos ao estresse crônico, e *in vitro*, após estimulação com catecolaminas.^{24,25} A Bernabé et al¹⁹ encontram que as células de carcinoma espinocelular (CEC) estimuladas com agonistas beta adrenérgicos produzem níveis elevados de IL-6, uma citocina altamente relacionado à proliferação celular tumoral. No mesmo trabalho, a inibição deste efeito o propranolol inibiu a produção de IL-6. Além disso, o bloqueio beta-

adrenérgico pode influenciar a evasão à apoptose das células tumorais durante a progressão da doença.^{31,32} Estudo prévio *in vitro* demonstrou que os beta-bloqueadores podem agir sinergicamente com quimioterápicos reduzindo a viabilidade celular e induzindo apoptose em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço.²⁶

Quanto aos resultados histopatológicos, observamos que os tumores do grupo Sham possuem um maior grau de queratinização quando comparados ao grupo Propranolol. De acordo com Bryne et al⁵⁰, um tumor com maior grau de queratinização é associado a um tumor mais diferenciado, fator indicativo de um tumor com um melhor prognóstico. Já para os outros critérios da classificação do grau de malignidade, incluindo o score final não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais. Porém, estes dados precisam ser avaliados com cautela já que com o efeito inibitório na incidência de CEC promovido pelo propranolol, parte das lesões que iriam se configurar como tumores iniciais (micro-invasivos) e com alto grau de diferenciação celular não evoluíram para carcinoma no grupo tratado com propranolol. Deste modo, é razoável inferir que no grupo controle não tratado com o beta-bloqueador se tenha um número maior de lesões incipientes em comparação ao grupo tratado com propranolol, o que poderia influenciar a análise dos dados referente aos aspectos microscópicos do tumor.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra pela primeira vez que o bloqueio beta-adrenérgico reduz a incidência e progressão do CEC de boca em um modelo de carcinogênese bucal em ratos. Nossos resultados sugerem que a ativação de receptores beta-adrenérgico é um importante mecanismo para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca quimicamente induzido. Estudos futuros são necessários para investigar os mecanismos moleculares e inflamatórios envolvidos neste processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Cancer. Fact sheet n° 297. Feb. 2006. Geneva.: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acesso em 10 de Junho de 2014.
2. 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.
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. Lutgendorf SK, Sood AK. Biobehavioral factors and cancer progression: physiological pathways and mechanisms. *Psychosom Med*. 2011 Nov-Dec;73(9):724-30. doi: 10.1097/PSY.0b013e318235be76. Review.
6. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3):240-8. Review.
7. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84. Review.
8. Fitzgerald PJ. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? *Int J Cancer*. 2009 Jan 15;124(2):257-63.
9. Jing Tanga, Zhijie Li b, Lan Lub, Chi Hin Cho b, -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy.
10. Steven W. Cole and Anil K. Sood. Molecular Pathways: Beta-Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1201-1206. Published OnlineFirst December 20, 2011.
11. Krizanova O, Babula P, Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer. *Stress*. 2016 Jul;19(4):419-28. doi: 10.1080/10253890.2016.1203415. PubMed PMID:27398826.
12. Schuller HM, Al-Wadei HA, Ullah MF, Plummer HK 3rd. Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):191-6. doi: 10.1093/carcin/bgr251.
13. Hermes GL, Delgado B, Tretiakova M, Cavigelli SA, Krausz T, Conzen SD, McClintock MK. Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 29;106(52):22393-8. doi: 10.1073/pnas.0910753106.
14. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 2006;12:939-44.
15. Lee JW, Shahzad MM, Lin YG, Armaiz-Pena G, Mangala LS, Han HD, et al. Surgical stress promotes tumor growth in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:2695-702.
16. Liu X, Wu WK, Yu L, Sung JJ, Srivastava G, Zhang ST, et al. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via betaadrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem* 2008;105:53-60.
17. Al-Wadei HA, Ullah MF, Al-Wadei MH. Intercepting neoplastic progression in lung malignancies via the beta adrenergic (beta-AR) pathway: implications for anti-cancer drug targets. *Pharmacol Res* 2012;66:33-40.
18. Al-Wadei HA, Plummer HK 3rd, Ullah MF, Unger B, Brody JR, Schuller HM. Social stress promotes and γ -aminobutyric acid inhibits tumor growth in mouse models of non-small cell lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012 Feb;5(2):189-96. doi: 10.1158/1940-

6207.CAPR-11-0177.

19. Bernabé DG¹, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SH. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun*. 2011 Mar;25(3):574-83. doi: 10.1016/j.bbi.2010.12.012. Epub 2010 Dec 25.
20. Canavese M, Ngo DT, Maddern GJ, Hardingham JE, Price TJ, Hauben E. Biology and Therapeutic Implications of VEGF-A Splice Isoforms and Single-Nucleotide Polymorp
21. Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10357-64.
22. Liu X¹, Wu WK, Yu L, Sung JJ, Srivastava G, Zhang ST, Cho CH. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta-adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem*. 2008 Sep 1;105(1):53-60. doi: 10.1002/jcb.21802.
23. Park SY, Kang JH, Jeong KJ, Lee J, Han JW, Choi WS, et al. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. *Int J Cancer*. 2011;128:2306–16.
24. Partecke LI¹, Speerforck S¹, Käding A¹, Seubert F¹, Kühn S¹, Lorenz E¹, Schwandke S¹, Sendler M², Keßler W¹, Trung DN¹, Oswald S³, Weiss FU², Mayerle J², Henkel C¹, Menges P¹, Beyer K¹, Lerch MM², Heidecke CD¹, von Bernstorff W⁴. Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade. *Pancreatology*. 2016 Mar 23. pii: S1424-3903(16)00080-6. doi: 10.1016/j.pan.2016.03.005
25. Huang JJ, Blobe GC. Dichotomous roles of TGF- β in human cancer. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15;44(5):1441-1454. Review. PubMed PMID: 27911726.
26. Wolter NE, Wolter JK, Enepekides DJ, Irwin MS. Propranolol as a novel adjunctive treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Oct;41(5):334-44. PubMed PMID: 23092836.
27. Landen Jr CN, Lin YG, Armaiz Pena GN, Das PD, Arevalo JM, Kamat AA, et al. Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007;67:10389–96.
28. Shahzad MM, Arevalo JM, Armaiz-Pena GN, Lu C, Stone RL, Moreno-Smith M, et al. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. *J Biol Chem*. 2010;285:35462–70.
29. Barbieri A¹, Bimonte S¹, Palma G¹, Luciano A¹, Rea D¹, Giudice A¹, Scognamiglio G², La Mantia E², Franco R², Perdonà S³, De Cobelli O⁴, Ferro M⁴, Zappavigna S⁵, Stiuso P⁵, Caraglia M⁵, Arra C¹. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2015 Aug;47(2):527-34. doi: 10.3892/ijo.2015.3038. Epub 2015 Jun 8.
30. Shang ZJ¹, Liu K, Liang DF. Expression of beta2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009 Apr;38(4):371-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00691.x. Epub 2008 Dec 30.
31. Sastry KS, Karpova Y, Prokopovich S, Smith AJ, Essau B, Gersappe A, et al. Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation. *J Biol Chem*. 2007;282:14094–100.
32. Jin Z¹, Gao F, Flagg T, Deng X. Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23837-44. Epub 2004 Mar 22.
33. Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):127-37.
34. Barnes PJ (1995) Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 838–860. pmid:7663795 doi: 10.1164/ajrccm.152.3.7663795
35. Pham H¹, Chen M, Takahashi H, King J, Reber HA, Hines OJ, Pandol S, Eibl G. Apigenin

- inhibits NNK-induced focal adhesion kinase activation in pancreatic cancer cells. *Pancreas*. 2012
36. Zhang N¹, Sun X¹, Sun M¹, Zhu S¹, Wang L¹, Ma D¹, Wang Y¹, Zhang S¹, Li P¹. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes esophageal squamous cell carcinoma growth via beta-adrenoceptors in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2015 Mar 5;10(3):e0118845. doi: 10.1371/journal.pone.0118845. eCollection 2015.
 37. Jin Z¹, Gao F, Flagg T, Deng X. Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23837-44.
 38. Perron L, Bairati I, Harel F, Meyer F. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control* 2004;15:535-41.
 39. Powe DG, Voss MJ, Zanker KS, Habashy HO, Green AR, Ellis IO, et al. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget* 2010;1:628-38.
 40. Algazi M, Plu-Bureau G, Flahault A, Dondon MG, Lê MG. [Could treatments with beta-blockers be associated with a reduction in cancer risk?]. *Rev Epidemiol Sante Publique*.; 52(1): 53-65; 2004.
 41. Schuller HM, Porter B, Riechert A. Beta-adrenergic modulation carcinogenesis in hamsters. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000 Nov;126(11):624-30.
 42. Pasquini M, Biondi M. Depression in cancer patients: a critical review. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2007 Feb 8;3:2.
 43. Watson M, Haviland JS, Greer S, Davidson J, Bliss JM. Influence of psychological response on survival in breast cancer: a population-based cohort study.
 45. Pitman RK, Milad MR, Igoe SA, Vangel MG, Orr SP, Tsareva A, Gamache K, Nader K. Systemic mifepristone blocks reconsolidation of cue-conditioned fear; propranolol prevents this effect. *Behav Neurosci*. 2011 Aug;125(4):632-8. doi:10.1037/a0024364.
 46. 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.
 47. Ribeiro DA, Fávero 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):910-5.
 48. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, WHO Classification of Tumours, 2005
 49. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis*. 1998 Jun;4(2):70-7. Review.
 50. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):167-78.
 51. Huang KM, Liang S, Yeung S, Oiyemhonlan E, Cleveland KH, Parsa C, Orlando R, Meyskens FL, Andresen B, Huang Y. Topically Applied Carvedilol Attenuates Solar Ultraviolet Radiation Induced Skin Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017 Aug
 53. Cikos S, et al. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 71, 145-153 (2005).
 54. DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J. & Shenoy, S.K. b-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol*. 69, 483-510 (2007).
 55. Makoto R. Hara¹, Jeffrey J. Kovacs¹, Erin J. Whalen¹, Sudarshan Rajagopal¹, Ryan T. Strachan¹, Wayne Grant², Aaron J. Towers^{1,3}, Barbara Williams¹, Christopher M. Lam¹, Kunhong Xiao¹, Sudha K. Shenoy¹, Simon G. Gregory^{1,3}, Seungkirl Ahn¹, Derek R. Duckett² & Robert J. Lefkowitz^{1,4} A stress response pathway regulates DNA damage through b2-adrenoreceptors and b-arrestin-1 doi:10.1038/nature10368
 56. Fan Sun^{1,3,*}, Xu-Ping Ding^{1,*}, Shi-Min An^{1,2}, Ya-Bin Tang^{1,2}, Xin-Jie Yang¹, Lin Teng^{1,5}, Chun Zhang^{1,4}, Ying Shen^{1,2}, Hong-Zhuan Chen^{1,2} & Liang Zhu^{1,2} Adrenergic DNA damage of embryonic pluripotent cells via β2 receptor

57. Melanie S. Flint^{1,2}, Andrew Baum³, Britteny Episcopo², Kelly Z. Knickelbein²,
Chronic exposure to stress hormones promotes transformation and tumorigenicity of
3T3 mouse fibroblasts

ANEXOS

Anexo A: