



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



ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA

**ESTUDO DA CARCINOGÊNESE BUCAL
EXPERIMENTAL UTILIZANDO-SE O ÓXIDO DE
NITROQUINOLINA (4-NQO) EM RATOS**

ARARAQUARA

2014





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



ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA

**ESTUDO DA CARCINOGÊNESE BUCAL EXPERIMENTAL
UTILIZANDO-SE O ÓXIDO DE NITROQUINOLINA (4-NQO)
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia - Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

ARARAQUARA

2014

Cabrera Ortega, Adriana Alicia.

Estudo da carcinogênese bucal experimental utilizando-se o óxido de nitroquinolina (4-NQO) em ratos / Adriana Alicia Cabrera Ortega - Araraquara: [s.n.], 2014.

74 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

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

ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA

**Estudo da carcinogênese bucal experimental utilizando-se
o óxido de nitroquinolina (4-nqo) em ratos**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

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

3º examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico.

Araraquara, 10 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA

NASCIMENTO: 19.09.1987 – México, DF

FILIAÇÃO: Arturo Cabrera Mc. Gregor

Leticia Elizabeth Ortega Valencia

2005 – 2010: Curso de Graduação em Odontologia

Universidad Autónoma de Nuevo León - UANL

2012 – 2014: Curso de Pós-Graduação em Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabajo a mis padres:

Leticia Elizabeth Ortega Valencia y Arturo Cabrera Mc. Gregor.

Mami tu siempre creíste en mí, me diste los mejores consejos cuando los necesitaba, y aunque ahora no estés físicamente conmigo, te tengo siempre en mi corazón y cada uno de mis sueños realizados van dedicados a ti, pues también son logros tuyos.

Papi siempre voy a estar agradecida por todo lo que has hecho por mí, tu has sido mi pilar y me has sostenido cuando sentía que me derrumbaba, me has enseñado a ser fuerte y perseverante. Gracias por caminar junto a mí, apoyándome en momentos difíciles y riendo conmigo en los felices.

Gracias a los dos por darme su apoyo y amor incondicional, los amo mucho.

Ustedes son mi ejemplo a seguir!.

AGRADECIMENTOS

Primero agradezco a ***Dios***, por darme la vida y permitirme lograr esto que tanto anhele.

A mi hermana ***Elizabeth Angélica Cabrera Ortega***, por apoyarme y siempre preocuparse por mi, te amo mucho.

A ***Juan Gabriel González Rodríguez***, fue difícil estar lejos, pero gracias amor por apoyarme siempre y creer en mí, este logro es de los dos, te amo.

A mi tía ***María Elizabeth Cárdenas Cerda***, por ayudarme desde antes de que iniciara la facultad, eres como mi segunda mamá, muchas gracias por todo lo que haz hecho por mí, te quiero mucho.

A ***toda mi familia***, que me apoya y cree en mí, los quiero.

A la ***familia González Rodríguez***, gracias por todo el apoyo que me han dado, por aceptarme en su familia y regalarme momentos inolvidables junto a ustedes, los quiero mucho!

À ***Vinícius Paiva***, sem você este trabalho não seria possível. Muito obrigada por tudo! Através deste trabalho, além do aprendizado, construímos uma amizade para toda a vida. Você tornou-se meu irmão. Adoro você!

Ao orientador ***Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório***, obrigada pela paciência desde que aqui cheguei. No início foi difícil a comunicação, mas não impediu que conseguíssemos trabalhar como uma equipe. Obrigada por todo o aprendizado e principalmente pela amizade!

À minha família brasileira, ***Vinícius Paiva, Cássio Rocha, Livia Moretti, Vinícius Ibiapina, Miriam Magro e Tiago Fonseca***. Agradeço por me fazerem sentir em casa, por todos os momentos de alegria compartilhados, e sempre estarem prontos à ajudar.

À ***Arturo Aranda e Fernando Vázquez***. Agradeço toda a ajuda desde que cheguei, e por todos os momentos alegres que passamos.

À ***Fabiana Curylofo e Morgana Guimarães***. Obrigada por toda a disponibilidade em ajudar na realização do trabalho e pela amizade.

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação... ***Adinael, Carol Venção, Cássio, Elton, Fabiana, Fausto, Fernanda, Fernanda Rocha, Giovanna, Gisselle, Guilherme, Haline, Jackeline, Lélis, Lígia, Livia Finoti, Livia Moretti, Marcel, Patrícia, Paulinha, Rafael, Raqueli, Renata, Roberta, Sâmara, Suzane, Vinícius Ibiapina, Vinícius Paiva***.

Aos meus *amigos do México*, que apesar de distantes sempre me apoiaram, e forneceram todo o ânimo para alcançar minhas metas.

Ao *Prof. Dr. Carlos Rossa Jr.*. Muito obrigada por toda a colaboração neste trabalho, e todos os ensinamentos.

Ao *Prof. Dr. Renato Leonardo e família*, agradeço pela recepção como se fosse parte de sua família, e por estarem sempre preocupados com meu bem estar. Um grande abraço.

Aos *Professores Dr. Mario Tanomaru e Dra. Juliane Tanomaru*, agradeço por possibilitarem minha vinda à esta Faculdade, e pela amizade.

Aos Professores Doutores do Curso de Mestrado em Periodontia... *Adriana Marcantonio, Carlos Rossa, Daniela Zandin, Elcio Marcantonio, Joni Augusto, José Eduardo*. Agradeço pelos ensinamentos nesses dois anos.

À *Leila Coimbra e João Paulo Steffens*, pela colaboração nas atividades do trabalho.

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

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

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

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

À *Diretoria da FOAr-UNESP* por toda a estrutura proporcionada à realização deste curso.

Ao *CNPq* pelo apoio financeiro durante a realização do Mestrado.

Ao *Brasil* e todas as pessoas que me acolheram durante minha jornada.

Cabrera Ortega, AA. Estudo da carcinogênese bucal experimental utilizando-se o óxido de nitroquinolina (4-NQO) em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi validar as alterações teciduais e moleculares durante os estágios iniciais do processo de carcinogênese oral experimental em ratos, utilizando-se 4-NQO. Foram utilizados 20 ratos com aproximadamente 4 meses de idade, aleatoriamente separados em grupos controle (n=10) e tratados com solução de 50 ppm de 4-NQO dissolvido na água de beber (n=10). Os animais do grupo controle foram sacrificados no primeiro dia do experimento e os animais do grupo experimental foram sacrificados após 8 e 12 semanas de tratamento. Os cortes histológicos provenientes da língua foram corados por H&E ou submetidas à reação de imunohistoquímica para detecção de PCNA, Bcl-2, SOCS1 e -3, e STAT3. Parte dos espécimes foi utilizada para a verificação da expressão de Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1 por RT-qPCR. Os resultados demonstraram que o tratamento com 4-NQO após 8 semanas causou displasia epitelial severa e que houve exacerbação da atipia celular após 12 semanas de tratamento. A positividade dos anticorpos analisados, com exceção do STAT3, foi aumentada em ambos os períodos experimentais. Os resultados do presente estudo apontam que tratamento com 4-NQO por 8 ou 12 semanas viabiliza avaliar as displasias epiteliais experimentais tanto a nível morfológico quanto molecular.

Palavras-chave: 4-Nitroquinolina-1-Óxido, ratos, língua, marcadores biológicos de tumor.

Cabrera Ortega, AA. Study of experimental oral carcinogenesis using nitroquinoline oxide (4-NQO) in rats [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to validate the tissue and molecular changes during the early stages of experimental oral carcinogenesis in rats, using 4-NQO. Were used 20 rats with approximately 4 months of age, randomly divided into control group (n = 10) and treated with 50 ppm of 4- NQO solution dissolved in drinking water (n = 10). The control group animals were sacrificed on the first day of the experiment and the experimental rats were sacrificed after 8 and 12 weeks of treatment. Histological sections from the tongue were stained with H&E or subjected to immunohistochemistry analysis for detection of PCNA, Bcl – 2, SOCS1 and -3, and STAT3. Part of the specimens was used to verify the expression of vimentin, Cdh1, Cdh2 and TWIST1 by RT - qPCR. The results showed that treatment with 4-NQO after 8 weeks caused severe dysplasia and cellular atypia was exacerbation after 12 weeks of treatment. The positivity of antibodies analyzed, with the exception of STAT3 was increased in both experimental periods. The results of this study indicate that treatment with 4-NQO for 8 or 12 weeks enables evaluating experimental epithelial dysplasias both morphological as molecular level.

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

Cdh1: E-caderina

Cdh2: N-caderina

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CEC: Carcinoma espinocelular oral

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DMBA: Dimetilbenzatraceno

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMT: Transição epitelial-mesenquimal

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H&E: Hematoxilina e Eosina

HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

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

RNA_m: Ácido Ribonucleico mensageiro

RNase: Ribonuclease

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RT-qPCR: Real Time quantitative polymerase chain reaction

SOCS1: Supressor de sinalização de citocina 1

SOCS3: Supressor de sinalização de citocina 3

STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TWIST1: Fator básico de transcrição 1

4HAQO: 4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido

4-NQO: Óxido de nitroquinolina

Δ CT: Comparativo C_T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O processo geral de carcinogênese	19
2.2 Eventos moleculares envolvidos na carcinogênese	21
2.2.1 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)	22
2.2.2 Bcl-2 (B-cell lymphoma2)	22
2.2.3 Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição (STAT).....	23
2.2.4 Supressores de Sinalização de Citocinas (SOCS)	24
2.2.5 Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1.....	25
2.3 Óxido de Nitroquinolina (4-NQO) como Modelo para o Estudo da Carcinogênese Bucal Experimental	26
2.3.1 Métodos de aplicação do 4-NQO	28
2.3.2 Lesões causadas pelo 4-NQO	29
3 PROPOSIÇÃO	31
3.1 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Animais	34
4.2 Sacrifício	34
4.3 Observações macroscópicas	35
4.4 Observações microscópicas	36
4.5 Imunohistoquímica	37

4.6 Expressão gênica de RNAm - RT-qPCR em tempo real	38
4.7 Análise dos resultados	39
5 RESULTADO	40
5.1 Peso Corporal dos Animais	41
5.2 Avaliação Macroscópica	41
5.3 Avaliação Microscópica (H&E)	41
5.4 Análise imunohistoquímica	47
5.5 PCR em tempo real	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	73



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Óxido de nitroquinolina (4-NQO) possui capacidade de exercer potente estresse oxidativo intracelular, por gerar 4-hidroxiaminoquinolona (4HAQO), um produto metabólico que se liga ao DNA, induzindo o aparecimento de um tumor bucal, mais especificamente carcinoma espinocelular (CEC) (Kanojia et al.²⁰, 2006). O 4-NQO quando em contato com as mucosas que recobrem principalmente a língua e o palato de rato, induz alterações moleculares que culminam no surgimento de discretas ou intensas atipias das células epiteliais. O conjunto de células atípicas podem levar à atipias arquiteturais que são facilmente identificáveis através de microscópio de luz transmitida comumente.

Os avanços no entendimento das alterações moleculares e celulares da carcinogênese, incluindo as fases iniciais do processo, possibilitam nortear a identificação de marcadores para que presumivelmente se estabeleça diagnósticos precoces e marcadores prognósticos. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), genes reguladores de apoptose (Bcl-2), genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS), genes transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1 e Cdh2, e TWIST1 são exemplos de proteínas que direta ou indiretamente estão envolvidas na carcinogênese de forma geral, possivelmente participando na transformação de lesão pré-maligna oral em maligna (Feng et al.¹³, 2013; Ohara et al.³⁶, 2013; Placzek et al.³⁹, 2010; Rong et al.⁴⁶, 2013; Wang et al.⁶⁵, 2013). Entretanto, o claro entendimento do processo inicial da carcinogênese, que resultaria na transformação de um tecido saudável em tecido que reside um tumor, ainda precisam ser explorados, isto é, estudar a carcinogênese oral, sem perder de vista as alterações das mucosas que, ocasionalmente, podem preceder o câncer da mucosa oral, como por exemplo, as lesões cancerizáveis ou potencialmente malignas.

Nesse contexto, para melhor compreensão do processo de carcinogênese em seus aspectos teciduais e moleculares, modelos de estudos visando o entendimento da

carcinogênese bucal experimental são rotineiramente utilizados em diferentes animais de laboratório, principalmente murinos e ratos (Henriques et al.¹⁷, 2011; Loyola et al.²⁵, 2011; Noguti et al.³², 2012). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os eventos teciduais e moleculares envolvidos nos estágios iniciais do processo de carcinogênese experimental, induzido pelo 4-NQO.



REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O processo geral de carcinogênese

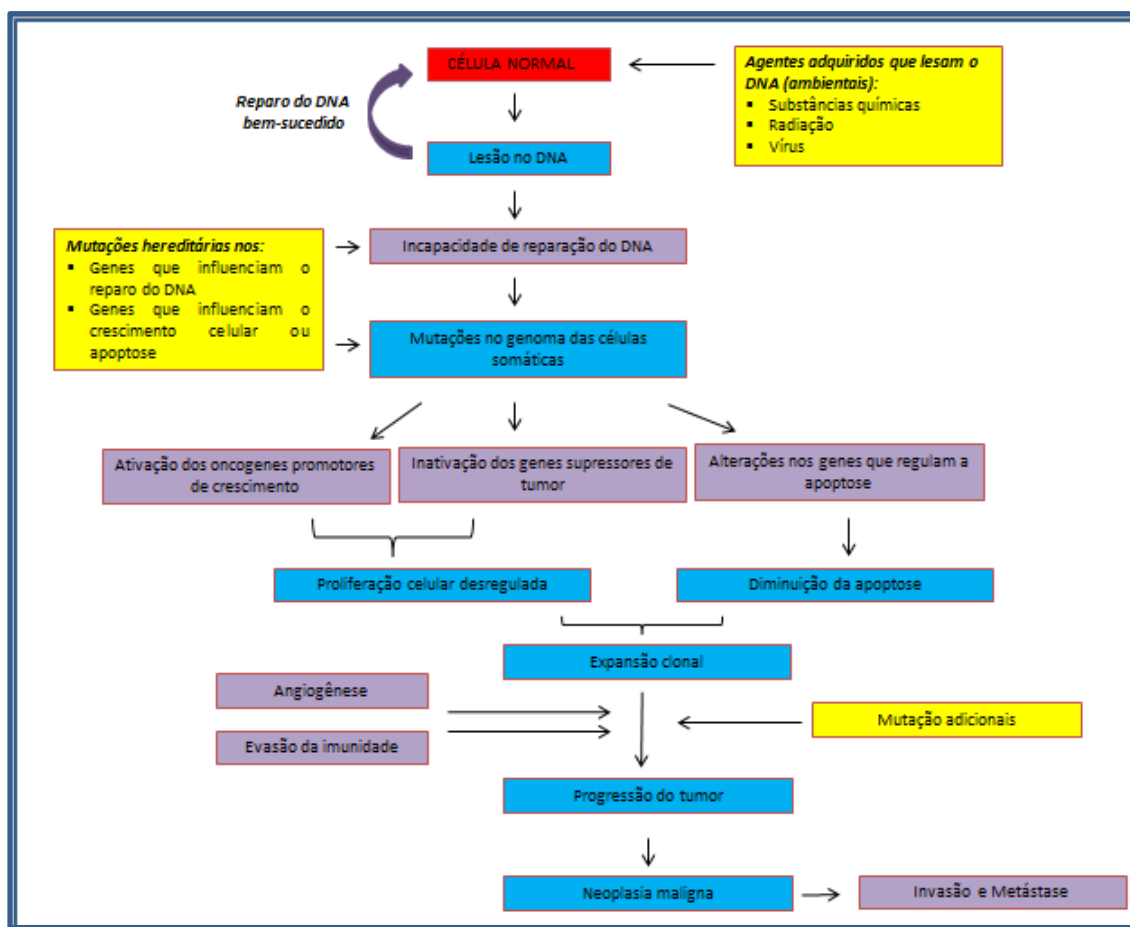
De acordo com Kumar et al.²² (2013) o mecanismo de formação do câncer, carcinogênese, é um processo de etapas múltiplas tanto a nível fenotípico quanto a nível genético, resultado do acúmulo de várias mutações. Tal processo envolve 3 estágios imprescindíveis à instalação da doença:

- **Iniciação** - Esta é a primeira etapa do processo de carcinogênese, onde as células normais sofrem lesão em seu DNA pela ação de determinado agente carcinogênico, tornando-se geneticamente modificadas;
- **Promoção** - Nesta segunda etapa, pela incapacidade de reparação, a lesão no DNA celular torna-se permanente e a atuação de agentes denominados oncopromotores favorece a proliferação celular enquanto afetam o mecanismo de apoptose dessas células;
- **Progressão** - Este último estágio caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, e o câncer encontra-se instalado evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Portanto, todo o processo inicia-se quando determinado agente com propriedades mutagênicas causa alteração no DNA celular, quadro este que pode ou não ser reparado. Nesse último caso de incapacidade de reparação do DNA, podem estar envolvidas mutações hereditárias nos genes que influenciam esse reparo e/ou também naqueles responsáveis pelo crescimento celular ou apoptose; resultando assim, em desregulada proliferação celular caso ocorra ativação dos oncogenes promotores de crescimento e a inativação dos genes supressores de tumor, e ainda na diminuição de apoptose uma vez alterados os genes que

regulam esse mecanismo celular. Concomitante, a formação de novos vasos sanguíneos associada a possíveis mutações adicionais e evasão da imunidade proporcionam a progressão do tumor a determinado momento em que se torna uma neoplasia maligna, esta caracterizada pela capacidade de invasão e metástase (Figura 1).

Figura 1 – Esquema simplificado do processo de carcinogênese.



Kumar et al.²² (2013) descrevem o dano genético não letal estar no âmago da carcinogênese, podendo tal dano (ou mutação) ser adquirido pela ação de substâncias químicas, radiação ou vírus, ou ainda, ser herdada na linhagem germinativa. A hipótese genética do câncer sugere que uma massa tumoral resulte da expansão clonal de uma só célula progenitora que sofreu dano genético. Ainda, de acordo com os autores, a nível molecular a progressão tumoral e a heterogeneidade associada resultam, mais provavelmente, de múltiplas

mutações que se acumulam independentemente em diferentes gerações de células, gerando subclones com diferentes características, como capacidade de invadir, taxa de crescimento, capacidade metastática, responsividade hormonal e suscetibilidade a drogas antineoplásicas.

2.2 Eventos moleculares envolvidos na carcinogênese

Atualmente a carcinogênese é entendida não como produto de uma única mutação, mas sim como o resultado de um acúmulo de alterações no genoma de uma célula. Essas alterações que se processam ao longo das múltiplas gerações de um clone celular, acabam gerando progressivamente características fenotípicas particulares que culminam, por fim, com a manifestação completa do fenótipo neoplásico. Vários são os genes que, quando alterados, participam de processos carcinogênicos. Em condições normais, porém, esses genes desempenham importantes papéis em vias relacionadas, ou à ativação, ou à proliferação celular. Quando o produto proteico normal desse gene age no sentido de promover a proliferação ou ativação celular, o gene mutado é chamado de oncogene. Quando, por outro lado, o gene codifica para alguma proteína que normalmente inibe a divisão ou a ativação da célula, a ele chamamos de antioncogene, ou gene supressor de tumor. Alguns genes são especificamente implicados na gênese de determinados tumores, enquanto outros se encontram alterados em várias neoplasias diferentes. Envolvidas a esses mecanismos, a atividade e propriedades de algumas proteínas específicas, como os antígenos nucleares marcadores da proliferação celular (PCNA), reguladores de apoptose (Bcl-2), supressores de sinalização de citocinas (SOCS), transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT3), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1, vêm sendo atribuídas ao desenvolvimento e progressão do câncer (Liu et al.²³, 2010; Ogata et al.³⁵, 2006; Ohara et al.³⁶, 2013; Placzek et al.³⁹, 2010; Rong et al.⁴⁶, 2013; Wang et al.⁶⁵, 2013; Yuen et al.⁷⁰, 2007; Zhang et al.⁷³, 2013).

2.2.1 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

O PCNA é uma proteína nuclear que circunda o DNA nuclear, constituindo-se como coordenador molecular dos mecanismos de síntese deste último, atuando no controle do ciclo celular e na resposta e reparo a danos ao DNA, sendo expresso em quantidades diferentes durante o ciclo celular e estando sua taxa de síntese diretamente relacionada com o índice de células em proliferação (Zhao et al.⁷⁴, 2012).

Nesse contexto, estudo realizado acerca da atividade do PCNA em animais com câncer demonstrou a expressão da proteína nos núcleos das células durante a fase de síntese de DNA do ciclo celular, constituindo como indicador da proliferação do tumor, demonstrando ainda, menor atividade da proteína nos grupos de animais que receberam tratamento e obtiveram uma menor progressão do câncer (Rong et al.⁴⁶, 2013).

Além da função de replicação, o PCNA orienta outros importantes processos celulares através da interação com uma série de proteínas envolvidas no processamento de DNA e reguladoras do ciclo celular (De Biaso et al.¹⁰, 2013). Portanto, devido à sua correlação com os mecanismos de proliferação celular, esse antígeno constitui-se como marcador geral do processo proliferativo das células, com importante valor diagnóstico em vários tipos de câncer (Guzinska-Ustymowicz et al.¹⁶, 2009), e ainda devido à sua atividade estabelecida, o PCNA vem sendo alvo de estudos que buscam, por exemplo, formas de inibir sua atividade, desenvolvendo potenciais agentes anticancerígenos (Punchihewa et al.⁴⁰, 2012) (De Biaso et al.¹⁰, 2013).

2.2.2 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

Bcl-2 é um proto-oncogene descoberto originariamente por análise de translocação cromossomal associada ao linfoma folicular de células B (Bakhshi et al.², 1985; Tsujimoto et al.⁵⁹, 1985), e inicialmente sua atividade foi descrita como codificadora de

proteína da membrana nuclear, da superfície interior da mitocôndria, e do retículo endoplasmático, revelando sua função de supressor de apoptose (Vaux et al.⁶¹, 1988) (Nishimura³¹, 1999).

No contexto da carcinogênese, concomitante ao processo de diferenciação e proliferação celular do câncer, a morte celular programada (apoptose) é outro mecanismo essencial uma vez que, normalmente, elimina a maioria das células cujo controle do ciclo celular é perturbado por mutações oncogênicas (Adams, Cory¹ 2007). Durante a carcinogênese as células cancerosas desenvolvem a capacidade de evitar a apoptose por meio da regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e / ou de regulação negativa de vias de sinalização pró-apoptóticas, permitindo sua sobrevivência mesmo quando submetidas a tratamentos quimioterápicos ou danos no DNA que normalmente desencadeiam respostas citotóxicas, sendo a família de ambas as proteínas pró e anti-apoptóticas de Bcl-2, reguladoras centrais dos mecanismos de apoptose (Placzek et al.³⁹, 2010).

2.2.3 Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição (STAT)

As proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT) representam um grupo de fatores de transcrição latente no citoplasma celular constituindo-se de sete diferentes membros, como descrito por Darnell⁹ (1997) (Calò et al.⁷, 2003). De acordo com Horvath¹⁸ (2000) tais fatores podem ser ativados por uma série de proteínas de sinalização extracelulares, tais como citocinas, fatores de crescimento e hormônios que se ligam a receptores específicos da superfície celular promovendo diferentes papéis nos processos celulares fisiológicos normais, tais como a diferenciação, proliferação, apoptose e angiogênese (Calò et al.⁷, 2003).

No entanto, como descreve Bowman et al.³ (2000) a ativação anormal de STAT ocasiona diferentes eventos patológicos, como por exemplo, a transformação celular e

oncogênese (Calò et al.⁷, 2003). De acordo com os autores (Buettner et al.⁶, 2002; Yu et al.⁷¹, 2009) os fatores de transcrição STAT, especialmente STAT3, desempenham um papel vital na iniciação e progressão do câncer e, portanto, como estabelecido por Bromberg et al.⁵ (1999) a sua ativação leva à excessiva expressão de unidades oncogênicas que conduzem à proliferação e metástases, e inibem a apoptose (Wang et al.⁶⁵, 2013). Wang et al.⁶⁵ (2013) destacam como aspecto importante na resposta aos agentes patogênicos a ativação do fator de transcrição STAT3 em resposta à citocina IL-6, constituindo-se como uma resposta normal controlada pelo principal regulador negativo supressor da sinalização de citocina, a proteína SOCS3.

2.2.4 Supressores de Sinalização de Citocinas (SOCS)

Os supressores de sinalização de citocinas (SOCS), especialmente SOCS3 e SOCS1, são proteínas classificadas como reguladoras negativas das vias de sinalização STAT (Yasukawa et al.⁶⁸, 2000) e, por meio dessa atividade estão envolvidas no desenvolvimento de câncer (Ohara et al.³⁶, 2013). De acordo com Ogata et al.³⁵ (2006), a remissão da expressão de SOCs3 conduz à hiperativação de STAT3, podendo contribuir no processo de carcinogênese e desenvolvimento de neoplasias malignas através da indução de múltiplos genes oncopromotores (Ohara et al.³⁶, 2013). Algumas atividades são descritas acerca de SOCS3, como sua atuação na supressão do crescimento celular em câncer de pulmão (Jablons¹⁹, 2003), e ainda resistência à apoptose e aumento da proliferação celular em carcinoma hepatocelular (Ogata et al.³⁵, 2006), nesses dois últimos casos pela não expressão daquela proteína (Trenkove, Ward⁵⁷, 2013).

Devido apresentar diversos efeitos sobre diferentes linhagens de células, SOCS1 têm sido estudada no contexto de várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso (Song et al.⁵², 2006), artrite reumatoide (Tsao et al.⁵⁸, 2008) e câncer (Zhang et al.⁷², 2012), e de

forma semelhante à SOCS3, a proteína SOCS1 pode influenciar a transdução de sinais proliferativos através da regulação STAT atuando na sobrevivência, diferenciação e transformação celular como descrito por Cooper et al.⁸ (2010) (Zhang et al.⁷², 2012). Ainda, sua atividade foi encontrada inibindo o crescimento de células cancerosas em próstata (Neuwirt et al.²⁹, 2009), estando o aumento de sua expressão associado à resistência na transformação oncogênica celular, através da inibição da proliferação e induzindo apoptose (Cooper et al.⁸, 2010), evidenciando a função de SOCS1 como supressor de tumor no processo de carcinogênese. Entretanto, suas funções em células tumorais durante a carcinogênese parecem ser complexas e controversas, devido em alguns casos ser observada uma expressão elevada em algumas células tumorais e, em outros, sua expressão estar silenciada (Zhang et al.⁷², 2012).

2.2.5 Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1

O processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) persiste durante todo o desenvolvimento embrionário dos mamíferos e também existe nos processos fisiopatológicos, incluindo a cicatrização de tecidos e fibrose de órgãos, estando implicado também no processo de carcinogênese, promovendo infiltração de células tumorais e metástases (Liu et al.²⁴, 2014). A EMT é caracterizada pela perda combinada das proteínas de junção de células epiteliais, tais como E-caderina (Cdh1), e o ganho de marcadores mesenquimais, tais como a vimentina, N-caderina (Cdh2) e TWIST1, que em conjunto proporcionam às células epiteliais a perda de suas características, e o ganho de propriedades mesenquimais, tornando-se móveis e adquirindo capacidade invasiva (Rho et al.⁴², 2009).

A vimentina quando associada às células epiteliais, indica a transição destas para células mesenquimais, sugerindo possível quadro de invasão celular e metástase (Liu et al.²³, 2010; Nijkamp et al.³⁰, 2011). De forma semelhante, outro gene relacionado ao processo de

transição celular epitelial para mesenquimal é o Cdh2, que também está relacionado a fenótipos malignos, estando altamente expresso em carcinoma oral de células escamosas (Domenico et al. ¹¹, 2011). Por outro lado, a redução da expressão de Cdh1 favorece o processo de transição da célula epitelial em mesenquimal, por proporcionar a perda de adesão entre as células, promovendo a progressão do processo carcinogênico. Ainda, implicado à progressão da carcinogênese encontra-se o TWIST1, gene envolvido em processos tardios, e atuando como preditor de metástases distantes (Xie et al. ⁶⁶, 2009).

2.3 Óxido de Nitroquinolina (4-NQO) como Modelo para o Estudo da Carcinogênese Bucal Experimental

Os primeiros modelos de estudo para carcinogênese bucal foram introduzidos pelo uso de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), reconhecidos como grupo de substâncias das mais potentes em oncogênese quimicamente induzida, sendo os principais exemplos de HPA o DMBA (dimetilbenzatraceno), o metilcolantreno, o benzopireno e o óxido de nitroquinolina (4-NQO) - (Brasileiro et al. ⁴, 2000).

Sintetizado por Ochiai em 1945 (Ochiai et al. ³⁴, 1957) o uso do 4-NQO em mucosa bucal foi descrito pela primeira vez por Fujino et al. ¹⁵ em 1965, os quais induziram carcinoma de lábio em hamsters através de aplicação tópica do carcinógeno. Entretanto, o 4-NQO como modelo experimental de carcinogênese bucal tornou-se mais utilizado quando Wallenius, Lekholm ⁶⁴ (1973), empregaram o carcinógeno diluído a 0,5% em propilenoglicol na boca de ratos; e desde então tem sido extensivamente usado para indução de carcinoma em variadas estruturas e diferentes animais, incluindo formas distintas de aplicação e variáveis períodos de exposição ao carcinógeno.

Constituído a partir de uma quinolina que reage com peróxido de hidrogênio incorporando um radical nitro, acredita-se que os efeitos carcinogênicos do 4-NQO sejam

decorrentes da redução enzimática do seu grupo nitro presente num dos seus anéis aromáticos, seguida da formação de um composto intermediário conhecido como 4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido (4HAQO) – (Henriques et al.¹⁷ 2011,). De acordo com Kanojia et al.²⁰ (2006), o 4HAQO induz um forte estresse oxidativo intracelular com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais parecem ser os responsáveis pela indução de mutações em bases nitrogenadas do DNA, deleções e conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (Tanaka et al.⁵⁵, 2002). Ribeiro et al.⁴³ (2004) demonstraram aumento significativo no dano do DNA incluindo sítios com reparação incompleta, em apenas 4 semanas de utilização de 4-NQO, e concomitante à essa atividade Nishimura et al.³¹ (1999) e Okazaki et al.³⁸ (2002) descreveram aumento da expressão de Bcl-2 anteriormente à mudanças histológicas no tecido quando empregado o carcinógeno (Kanojia et al.²⁰, 2006).

O Óxido de Nitroquinolina (4-NQO), como um dos tipos de substância cancerígena pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), foi considerado o melhor carcinógeno atualmente disponível para a produção da carcinogênese bucal em ratos, por induzir a formação dos estágios sequenciais da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), e estudos evidenciam que suas alterações histológicas e moleculares são similares as que ocorrem em humanos, promovendo a formação de tumores bem diferenciados (Kanojia et al.²⁰, 2006). Alguns estudos (Nauta et al.²⁰, 1995; Yuan et al.⁶⁹, 1997; Tang et al.⁵⁶, 2004) já afirmavam que modelos de 4-NQO poderiam ser os melhores sistemas experimentais disponíveis para investigação das alterações histológicas e moleculares que ocorrem durante a carcinogênese bucal em humanos, e da progressão do câncer (Tang et al.⁵⁶, 2004).

2.3.1 Métodos de aplicação do 4-NQO

A literatura demonstra que a aplicação do óxido de nitroquinolina (4-NQO) na cavidade bucal ocorreu inicialmente em 1965, quando Fujino et al.¹⁵ utilizaram o carcinógeno diluído a 0,25% em benzeno, aplicando-o topicamente (Tanaka et al.⁵⁵ 2002; Tang et al.⁵⁶, 2004).

A partir desse estudo, variados métodos de aplicação do 4-NQO foram sugeridos e introduzidos na pesquisa da carcinogênese experimental. Entretanto, o carcinógeno utilizado através da diluição em benzeno foi substituído algum tempo depois pelo preparado diluído a 0,5% em propilenoglicol e aplicado três vezes por semana utilizando-se um pincel, como demonstrado no estudo de Wallenius, Lekholm⁶⁴ (1973). O mesmo método de aplicação foi utilizado por Henriques et al.¹⁷ (2011), em seu estudo, onde grupos experimentais receberam a aplicação do 4-NQO diluído a 0,5% em propilenoglicol, com auxílio de um pincel, na borda lateral esquerda da língua.

A literatura demonstra estudos (Loyola et al.²⁵, 2011) embasados no protocolo descrito por Tang et al.⁵⁶ (2004), em que o carcinógeno 4-NQO é diluído inicialmente em propilenoglicol (5 mg/ml) e depois em água filtrada até atingir a concentração final de 100 µg/ml, sendo que durante todo o período de tratamento, a solução de 4-NQO é preparada e trocada semanalmente nos frascos de beber dos animais. Noguti et al.³² (2012) em seu estudo avaliaram alterações induzidas pelo 4-NQO utilizando-se uma solução de 50 ppm do carcinógeno na água dos animais, por um período mínimo de 4 semanas, 12 e máximo de 20 semanas.

Diante dos métodos de aplicação demonstrados pela literatura e considerando-se as observações de Svensson, Heiden⁵⁴ (1982) e Steidler, Reade⁵³ (1984), de que o período de aplicação assim como a concentração do 4-NQO influenciam, modificando a quantidade e o tempo de aparecimento das lesões, é necessário considerar que tanto o modo de aplicação do

4-NQO quanto o período de exposição devem ser empregados dentro de parâmetros que facilitem e viabilizem o experimento, mantendo a capacidade do agente carcinogênico à indução do processo de carcinogênese. De acordo com Kanojia et al.²⁰ (2006) diferentes dosagens e períodos de indução empregando-se o carcinógeno devem estar de acordo com diferentes linhagens, condições e/ou dieta em que são expostos os animais.

Considerando-se que uma das vias mais importantes de administração dos carcinógenos bucais é através de soluções líquidas (Okazaki et al.³⁸, 2002; Vered et al.⁶², 2003; Ribeiro et al.⁴⁴, 2005), e ainda, baseando-se no processo de várias etapas da carcinogênese caracterizada pela iniciação, promoção e progressão do tumor, atualmente a administração crônica de 4-NQO, associada à água de beber, simula de forma muito semelhante o processo carcinogênico como ocorre no ser humano, estabelecendo-se essa metodologia como a principal forma de carcinogênese bucal experimental (Fracalossi et al.¹⁴, 2011; Nogutti et al.³², 2012).

2.3.2 Lesões causadas pelo 4-NQO

A primeira descrição sobre indução de câncer pelo 4-NQO foi em 1965 quando Fujino et al.¹⁵, ao aplicar o carcinógeno em lábio de rato, observaram desenvolvimento de carcinomas tanto de lábio quanto de língua.

Em seu estudo, Noguti et al.³² (2012) realizaram a aplicação do carcinógeno na água dos animais por um período mínimo de 4 semanas, 12 e máximo de 20 semanas, e observaram as primeiras modificações somente a partir da 12ª semana de aplicação do 4-NQO, havendo desde hiperplasias, hiperqueratoses, até displasias de formas moderadas; e a partir da 20ª semana relataram displasias de moderadas a severas, e carcinoma de células escamosas, com predominância desse último tipo.

Henriques et al.¹⁷ (2011) realizaram estudo em ratos aplicando topicamente o 4-NQO em borda lateral esquerda da língua, e observaram displasias leves a moderadas após 2 meses de aplicação do 4-NQO, ocorrendo modificações mais acentuadas apenas a partir do terceiro e quarto mês, estando presentes além de displasias moderadas, carcinomas *in situ* e carcinoma superficialmente invasivo, respectivamente.

De acordo com Mognetti et al.²⁶ (2006), aplicações repetidas do 4-NQO produzem carcinoma espinocelular em língua de ratos; e tais mudanças histopatológicas observadas no epitélio lingual durante o processo são hiperplasia, atipia leve, moderada e severa antes da formação do carcinoma invasivo (Tanaka et al.⁵⁵, 2002).

Há poucos trabalhos na literatura abordando os efeitos do óxido de nitroquinolina sobre os tecidos gengivais. Wallenius, Lekholm⁶⁴ (1973) relataram lesões em gengiva inferior em três, dos treze ratos tratados com 4-NQO por sete meses. Já em outros locais, obtiveram maiores porcentagens de lesões, sendo 100% de presença de lesões em palato e 75% de lesões em língua. Ohne et al.³⁷ (1981) relataram indução de carcinoma espinocelular após 7 meses de tratamento em todos os ratos tratados, sendo que 18 ratos apresentaram lesões em língua, 15 no palato duro, 4 no palato mole, 2 na mucosa jugal e 3 ratos apresentaram lesões na gengiva, sendo duas destas lesões ulceradas.



PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

- Este trabalho teve como objetivo validar as alterações teciduais e moleculares durante os estágios iniciais do processo de carcinogênese experimental, induzido pelo 4-NQO em ratos.

3.1 Objetivos específicos

- Validar as alterações epiteliais induzidas pelo 4NQO, através da análise histológica pela coloração de H&E.
- Avaliar a imunoexpressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), genes reguladores de apoptose (Bcl-2), supressores de sinalização de citocina (SOCS1 e -3), transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT3);
- Analisar a expressão gênica por RT-qPCR de Vimentina, Cdh1, Cdh2 e TWIST1.



MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

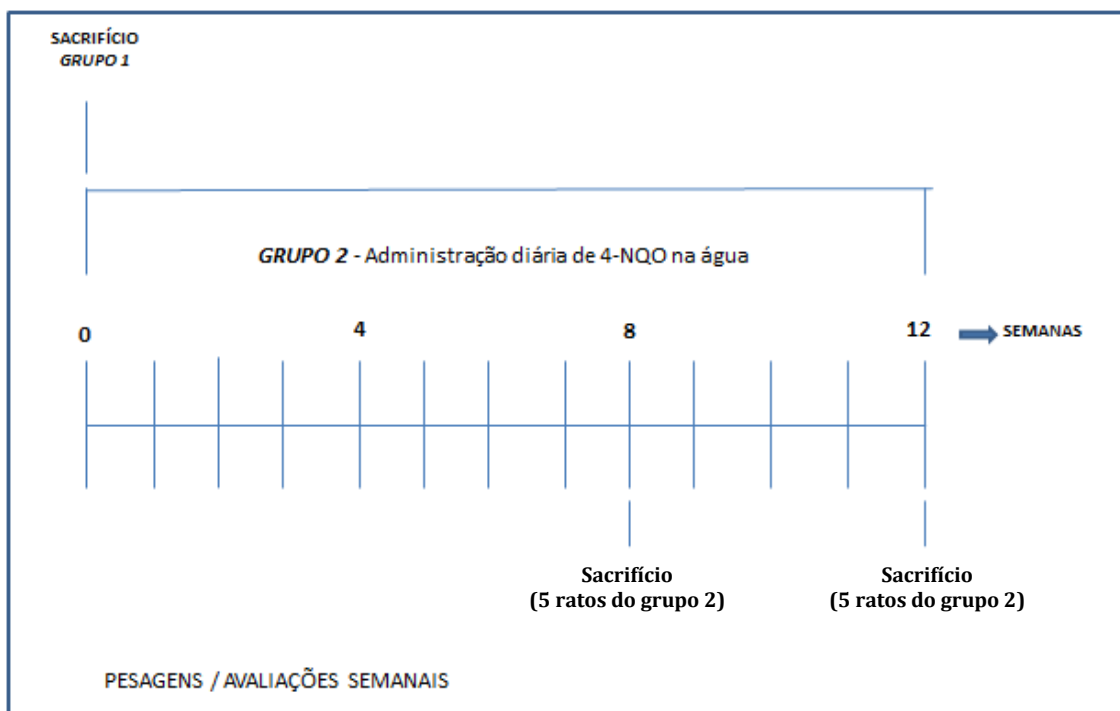
Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Proc. CEUA nº 14/2012) (Anexo).

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), machos, com aproximadamente 3-4 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Campus de Araraquara. Os animais foram aleatoriamente separados em 2 grupos de 10 animais (grupo controle e grupo experimental) e mantidos em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola) em um ambiente com temperatura ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12 escuro) controlados, com livre acesso à ração e água. Os animais do grupo controle, que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, foram sacrificados no primeiro dia do experimento (Vered et al.⁶³, 2007; Noguti et al.³², 2012). Os animais do grupo experimental foram submetidos ao tratamento com solução de 50 ppm de 4-NQO (Sigma, USA) dissolvida na água de beber por 8 ou 12 semanas. O protocolo de tratamento com 4-NQO se baseia no processo de iniciação, promoção e progressão do tumor no rato, semelhante ao que acontece no ser humano (Ribeiro et al.⁴⁵, 2007) (Figura 2).

4.2 Sacrifício

O sacrifício dos animais do grupo experimental ocorreu ao final da 8ª e 12ª semana do início do experimento, por aprofundamento anestésico, composto por 80mg/kg de peso corporal de cetamina e 20 mg/kg de peso corporal de xilazina (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática dos períodos estabelecidos para a administração diária de 4-NQO e sacrifício dos animais.



4.3 Observações macroscópicas

Após o sacrifício dos animais de ambos os grupos, a língua de cada animal (n=5) foi retirada, fixada em formol tamponado a 10% (pH 7.2) durante pelo menos 48h. Após a fixação realizou-se a análise macroscópica das línguas. Foi observado se houveram modificações de contorno, alterações de coloração, úlceras e lesões exofíticas. Em seguida as línguas foram lavadas em água corrente por 24h. Após estes procedimentos, as línguas foram incluídas em parafina para obtenção de cortes semi-seriados de 5µm de espessura no sentido longitudinal (ântero-posterior). Foram obtidos 40 cortes da língua, por animal de cada grupo, onde metade dos cortes foi corada com Hematoxilina e eosina (H&E), e a outra metade submetida à reação de imunohistoquímica.

4.4 Observações microscópicas

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

Nas regiões que apresentaram displasias, foram adotados os critérios de Smith & Pindborg⁵¹ (1969) para avaliação. As alterações do epitélio displásico avaliadas foram: cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, perda de polaridade das células basais, estratificação irregular do epitélio, queratinização de células individuais ou grupos de células da camada espinhosa e perda de coesão celular típica. As alterações das células displásicas avaliadas, também seguiram os critérios de Smith, Pindborg⁵¹ (1969): núcleos grandes e proeminentes, relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hipercromáticos, pleomorfismo celular, aumento na atividade mitótica, presença de mitoses atípicas.

Na presença de tais alterações, era realizada a classificação quanto à intensidade displásica de acordo com os critérios propostos por Van Der Waal⁶⁰ (1997):

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

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

4.5 Imunohistoquímica

Foram utilizados cortes histológicos da porção posterior da língua de 5 animais por grupo e de ambos os períodos (8 e 12 semanas), devido serem observadas alterações mais acentuadas nessa região, como demonstrado pelas observações microscópicas por H&E. A reação de imunohistoquímica foi realizada para detecção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), marcadores de apoptose (Bcl-2), bem como supressores da sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3), e ativadores de transcrição (STAT3). O procedimento para imunohistoquímica foi otimizado para cada anticorpo/proteína alvo: PCNA (1:100 – Invitrogen 133900), Bcl-2 (1:200 – abcam 7973), SOCS1 (1:200 – Santa Cruz Biotechnology 9021), SOCS3 (1:200 – abcam 16030), STAT3 (1:200 – Santa Cruz Biotechnology); e a detecção das proteínas alvo realizada pelo sistema DAB-streptavidina (LSAB-2, Dako Cytomation). Em síntese, cortes seriados (5 µm de espessura) das peças incluídas em parafina foram obtidos e subsequentemente montados em lâminas silanizadas. As lâminas receberam lamínulas de vidro colocadas com permount, devidamente nas condições a serem observadas e fotografadas com microscópio de luz transmitida comumente. A análise da intensidade da marcação por imunohistoquímica foi realizada pelo método H-score. Para a determinação do H-score, tanto a intensidade (0-3) da marcação positiva quanto a percentual (0-100) de células com marcação positiva de uma determinada intensidade foram levados em consideração. Por exemplo, uma amostra com 10% das células com intensidade 3; 30% das células com intensidade 2; 20% com intensidade 1 e 40% das células não coradas, resultará em um H-score de $110 - (10 \times 3) + (30 \times 2) + (20 \times 1) + (40 \times 0) = 110$. O H-score foi determinado para cada proteína alvo de cada grupo experimental.

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

Foram utilizadas amostras de 5 animais por grupo, referentes apenas ao período de 12 semanas. O RNA total referente à parte final da região posterior das línguas coletadas, foi extraído com o *kit* RNeasy MiniR (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. A quantidade e pureza do RNA proveniente das amostras foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita por reação de transcrição reversa (RT) de 300 ng de RNA total utilizando 2.5 μ M de primers Oligo (dT)-16 e 1.25 U/uL da transcriptase reversa obtida do vírus da leucemia Moloney de roedores (Moloney murine leukemia virus) na presença de 5.5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTPs e 0.4 U/ μ L de inibidor de RNase, segundo o protocolo do fabricante (High Capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystems). As reações de PCR foram feitas em placas de 96 poços com um volume final de 20 μ L que inclui Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) para cada gene: Twist1 (twist homolog 1), Rn 00585470_s1; Vim (Vimentin), Rn00579738_m1; Cdh1 (cadherin 1), Rn00580109_m1; Cdh2 (cadherin 2), 00580099; Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), NM008084. As condições das reações de PCR foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, as análises da expressão gênica foram realizadas em duplicata. Para normalizar a quantidade de cDNA total presente em cada reação, a expressão de GAPDH, que não foi alterada pelas condições experimentais, foi usada como controle endógeno por ser um gene constitutivo. Para comparar os níveis de expressão entre as diferentes amostras, o nível de expressão relativa dos genes foi calculado usando o método comparativo Δ CT utilizando o software da termocicladora.

4.7 Análise dos resultados

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



RESULTADO

5 RESULTADO

5.1 Peso Corporal dos Animais

O tratamento com 4-NQO não demonstrou diferenças significativas de peso corporal dentro dos mesmos períodos experimentais. O ganho de peso corporal de todos os ratos após 8 e 12 semanas apresentou-se uniforme.

5.2 Avaliação Macroscópica

Ao término dos respectivos períodos experimentais foi verificada discreta modificação macroscópica quando comparado ao grupo controle. Nos animais submetidos à carcinogênese pelo período de 8 semanas, foi observado que as línguas apresentavam apenas diferença na rugosidade; enquanto que no período de 12 semanas essa característica foi acompanhada pela presença de áreas opacas, distribuídas principalmente nas regiões média e posterior da língua. Entretanto, foram alterações imensuráveis, devido ao tênue delimitação de contorno.

5.3 Avaliação Microscópica (H&E)

Microscopicamente, as línguas dos animais do grupo controle apresentavam-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado em toda sua extensão dorsal, diferindo morfológicamente de acordo com a região analisada (anterior, média e posterior). A região anterior era revestida por epitélio com interdigitações menos proeminentes quando comparadas às outras regiões (média e posterior), estando recoberto por delgada camada de queratina (Figuras 3A e 4A). A região média apresentava aspectos semelhantes, adquirindo um discreto espessamento tanto do epitélio quanto da camada de queratina, delineando

aspecto de dente de serra (Figuras 3B e 4B). Era possível observar ainda, na região média mais próxima ao início da área posterior, as papilas fungiformes descritas com aparência de cogumelo recobertas por epitélio de maior adelgaçamento (Figuras 3B e 4B). Na região posterior o epitélio projetava-se de forma proeminente, tanto em direção ao tecido conjuntivo quanto para a face externa, apresentando-se recoberto por espessa camada de queratina com características de dente de serra, região onde estão localizadas as papilas filiformes (Figuras 3C e 4C).

Após o tratamento com 4-NQO por 8 semanas verificou-se discreta ou nenhuma mudança na espessura do epitélio da região anterior quando comparado à língua dos animais do grupo controle, apresentando uma displasia leve (Figuras 3D e 4D / Tabela 1). Foi observada atrofia epitelial da porção média e ainda, presença de mitoses atípicas na camada espinhosa acompanhada de mudanças nas características de normalidade das células basais, traduzindo-se em displasia moderada, além de perda da característica de dentes de serra da camada de queratina (Figuras 3E e 4E / Tabela 1). No mesmo período, foram observadas alterações mais evidentes na região posterior da língua, havendo acentuado espessamento epitelial com maior aprofundamento das cristas epiteliais em direção ao tecido conjuntivo, maior quantidade de figuras mitóticas, perda de polaridade celular e perda de adesão das células basais, traduzindo-se em displasia severa (Figuras 3F e 4F / Tabela 1).

Após o tratamento com 4-NQO por 12 semanas, foram verificadas mudanças morfológicas mais acentuadas no tecido epitelial quando comparadas às línguas dos animais do grupo controle e submetidos à carcinogênese por 8 semanas. Nas regiões anterior e média foi observada maior proliferação celular, figuras de mitoses atípicas em maior número, relação núcleo/citoplasma aumentada, traduzindo-se em displasia moderada, ocorrendo também modificação da camada de queratina (Figuras 3G e 4G / Figuras 3H e 4H) (Tabela 1). Na região posterior as alterações foram mais pronunciadas, intensa quantidade de figuras

mitóticas estendendo-se à camada epitelial granular, perda de adesão intercelular, distúrbio de polaridade das células basais, correspondendo à displasia severa (Figuras 3I e 4I / Tabela 1). Em um caso, observou-se fenda do epitélio com rompimento da camada granulosa (Figuras 3I e 4I), como visualizado em maiores detalhes na Figura 5.

Tabela 1 – Critérios utilizados na caracterização microscópica das displasias epiteliais encontradas nos ratos tratados com 50ppm de 4NQO por 8 e 12 semanas.

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

Figura 3 – Fotomicrografias comparando os diferentes estágios da carcinogênese em língua de ratos. As figuras **A**, **B** e **C** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo controle, respectivamente, onde pode ser observada na figura **B** estrutura da papila fungiforme (*). As figuras **D**, **E** e **F** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo submetido ao 4-NQO pelo período de 8 semanas, respectivamente. E as figuras **G**, **H** e **I** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo submetido ao 4-NQO pelo período de 12 semanas, respectivamente. Podem ser observadas alterações epiteliais e atipias celulares mais acentuadas na região posterior de ambos os períodos, porém mais severas no período de 12 semanas de carcinogênese pelo 4-NQO. Coloração H.E. x20

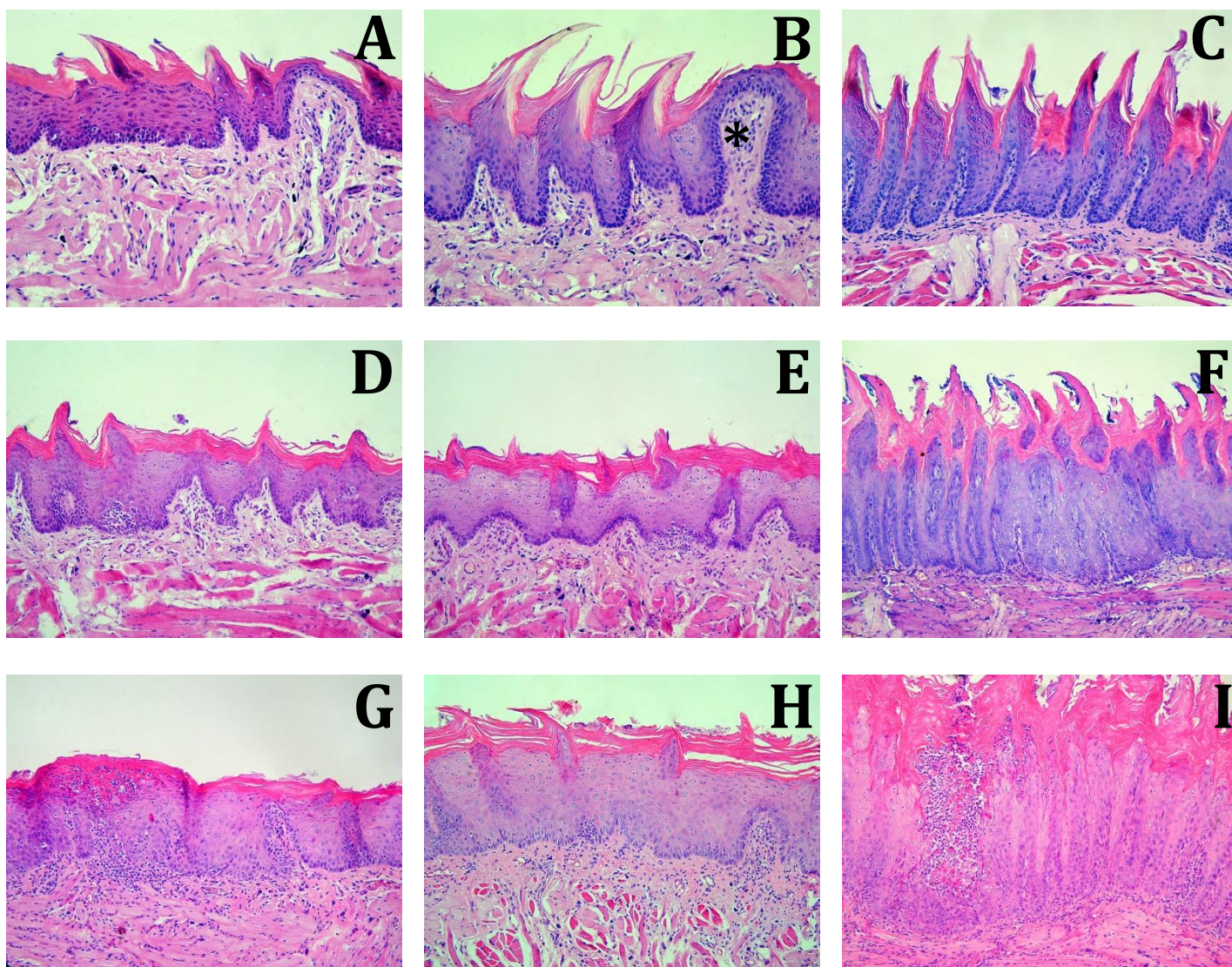


Figura 4 – Fotomicrografias em maiores detalhes, respectivas às figuras dispostas na **FIGURA 3** comparando os diferentes estágios da carcinogênese em língua de ratos. As figuras **A**, **B** e **C** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo controle, respectivamente, onde pode ser observada na figura B estrutura da papila fungiforme (*). As figuras **D**, **E** e **F** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo submetido ao 4-NQO pelo período de 8 semanas, respectivamente. E as figuras **G**, **H** e **I** correspondem às regiões anterior, média e posterior, do grupo submetido ao 4-NQO pelo período de 12 semanas, respectivamente. Podem ser observadas alterações epiteliais e atipias celulares como mitoses atípicas (ver setas), por exemplo, desde a região média, porém de forma mais acentuada na região posterior de ambos os períodos, demonstrando maior severidade no período de 12 semanas de carcinogênese pelo 4-NQO. Ainda, na figura I, pode-se verificar fenda do epitélio com rompimento da camada granulosa. Coloração H.E. x40

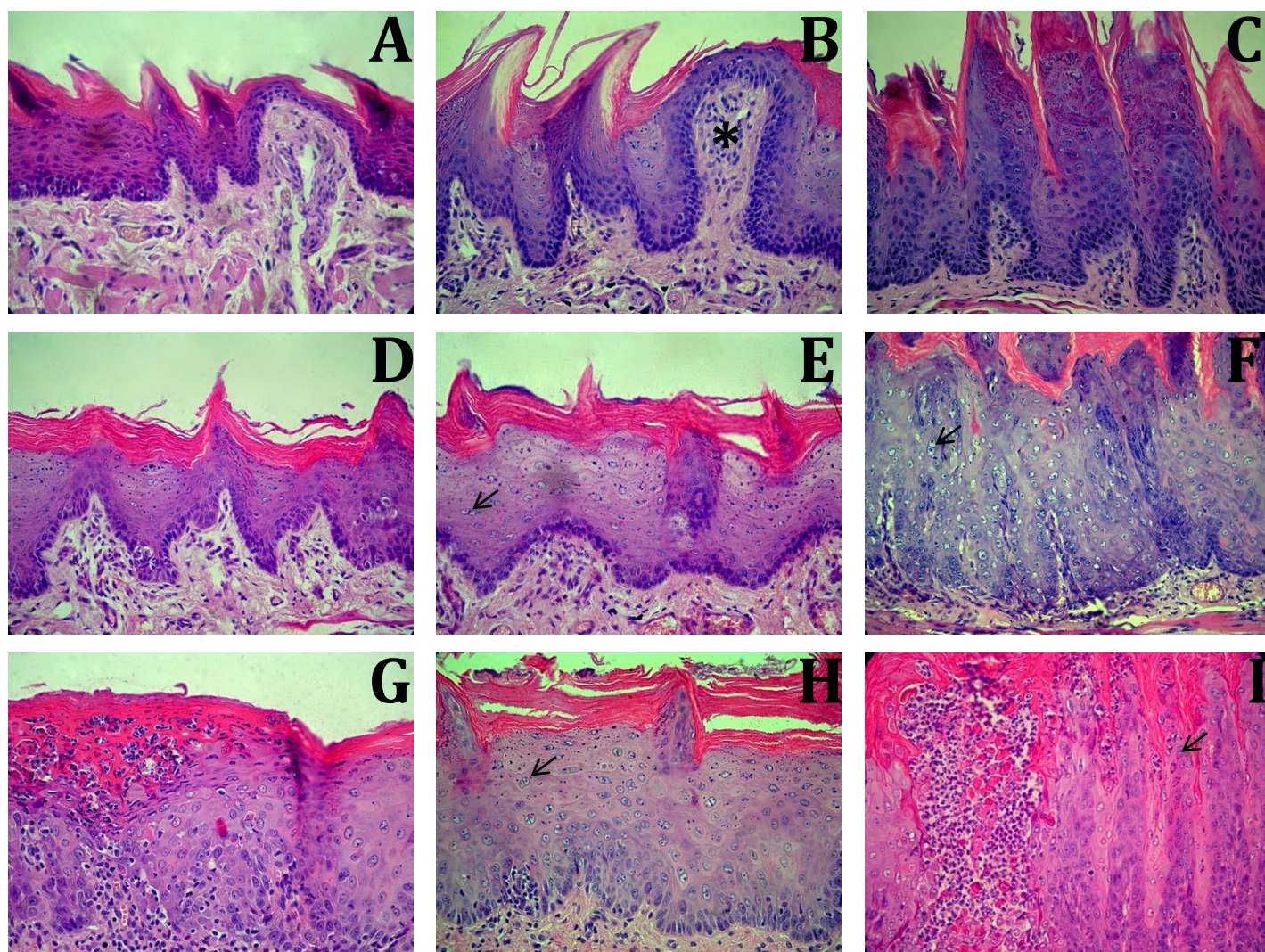
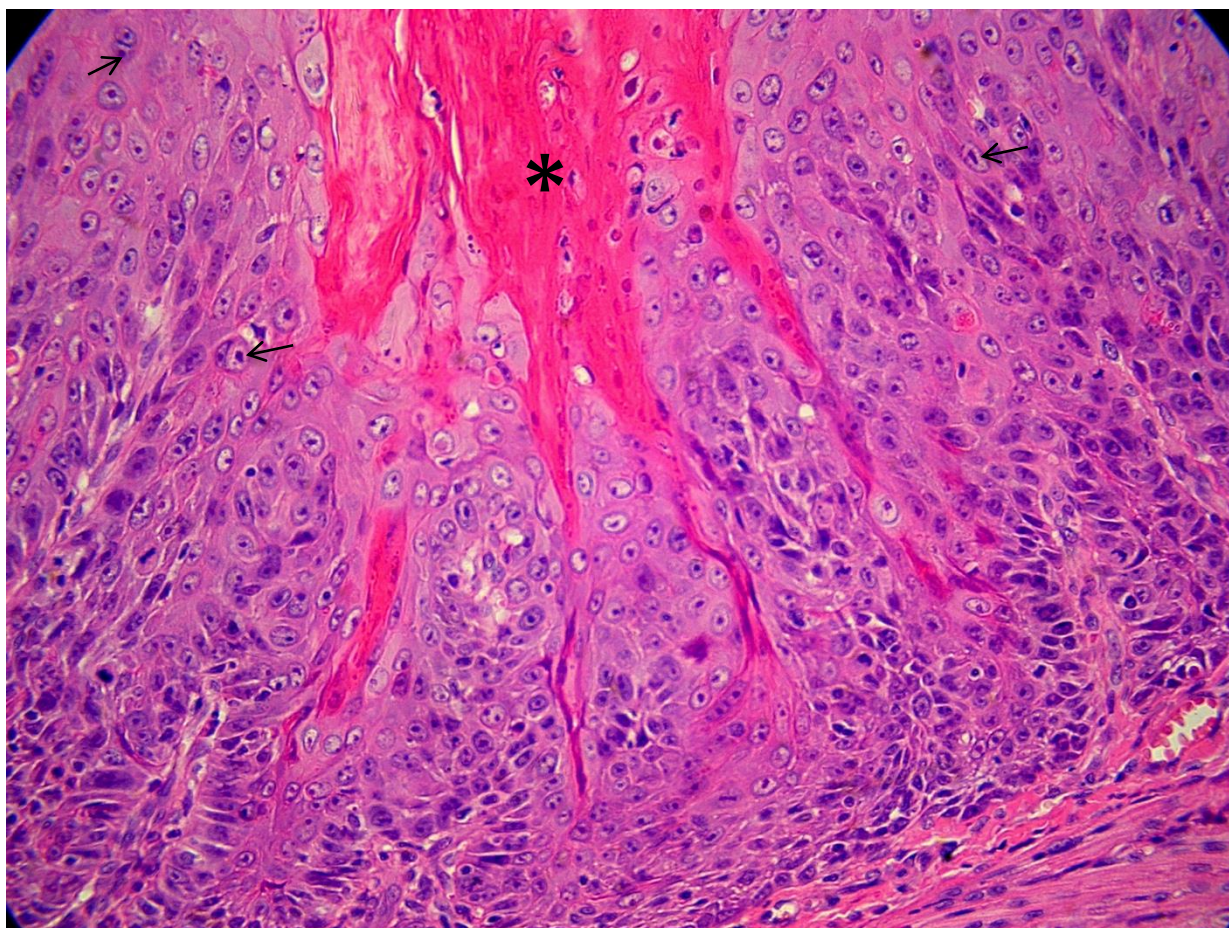


Figura 5 – Fotomicrografia referente à área posterior de língua, do grupo submetido à carcinogênese por 4-NQO pelo período de 12 semanas, onde foram observadas as alterações mais severas, caracterizando-se neste caso displasia severa, acompanhada de fenda do epitélio com rompimento da camada granulosa. Nesta figura podem ser observadas atipias celulares acentuadas (ver setas), como alteração da relação núcleo/citoplasma das células, perda de adesão das células basais, mitoses atípicas em grande quantidade, e invaginação da camada de queratina (*). Coloração H.E. x40



5.4 Análise imunohistoquímica

A imunomarcação do **PCNA** foi exclusivamente nuclear, onde a totalidade das amostras do grupo controle apresentou expressão positiva para PCNA (H-score = 273%) sendo a marcação mais restrita às células da camada basal, assim como para o grupo experimental. Em ambos os períodos experimentais, a expressão do anticorpo foi aumentada em 147% (H-score = 402%) e 111% (H-score = 305%), respectivamente, com o tratamento de 4-NQO comparando-se com o controle, porém esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$) (Figura 6).

O anticorpo **Bcl-2** apresentou marcação exclusivamente em membrana, para todas as amostras (100%) do grupo controle (H-score = 146%), ocorrendo nos diferentes estratos do epitélio, o que também foi observado no grupo experimental de ambos os períodos. Após 8 ou 12 semanas de tratamento com 4-NQO, a marcação para Bcl-2 aumentou 226% (H-score = 331%) e 210% (H-score = 307%), respectivamente, sendo que somente os valores obtidos após 8 semanas de tratamento foram significativos quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 7).

A marcação para **SOCS1** também ocorreu em membrana celular, demonstrando positividade em 100% das amostras avaliadas no grupo controle (H-score = 45%), distribuindo-se nos diferentes estratos do epitélio da língua, assim como no grupo experimental de ambos os períodos. O aumento do anticorpo no grupo tratado com 4-NQO diferiu estatisticamente quando comparado ao controle ($p < 0,05$), tanto no período de 8 quanto 12 semanas, apresentando aumento de 251% (H-score = 113%) e 177% (H-score = 80%), respectivamente, em relação ao controle negativo. (Figura 8).

Para o anticorpo **SOCS3** a imunomarcação ocorreu tanto em membrana citoplasmática quanto citoplasma, e apresentou positividade em 100% dos casos avaliados no

grupo controle (H-score = 39%), estando distribuída em todas as camadas epiteliais, demonstrando o mesmo padrão de distribuição nas amostras do grupo experimental. A expressão do anticorpo foi aumentada em 505% (H-score = 197%) e de forma estatisticamente significativa no grupo tratado com 4-NQO, referente ao período de 8 semanas ($p < 0,05$); enquanto que no período de 12 semanas esse aumento foi de 148% (H-score = 58%), porém não diferindo estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 9).

A imunomarcção de **STAT3** também ocorreu tanto em membrana quanto em citoplasma, ocorrendo em 100% das amostras do grupo controle (H-score = 20%) e distribuindo-se em todos os estratos epiteliais, assim como no grupo experimental referente a cada período. Contrariamente aos demais anticorpos a expressão de STAT3 apresentou-se reduzida no grupo tratado com 4-NQO comparada ao grupo controle, tanto em 8 quanto 12 semanas, ocorrendo em 30% (H-score = 6%) e 5% (H-score = 1%), respectivamente; diferença esta, estatisticamente significativa apenas para o grupo do período de 12 semanas ($p < 0,05$) (Figura 10).

Figura 6 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo PCNA, em região posterior da língua. O grupo controle é representado pela imagem **A**, e as imagens **B** e **C** representam os grupos submetidos à carcinogênese pelos períodos de 8 e 12 semanas, respectivamente. Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (Não houve diferença estatística, $p > 0,05$)

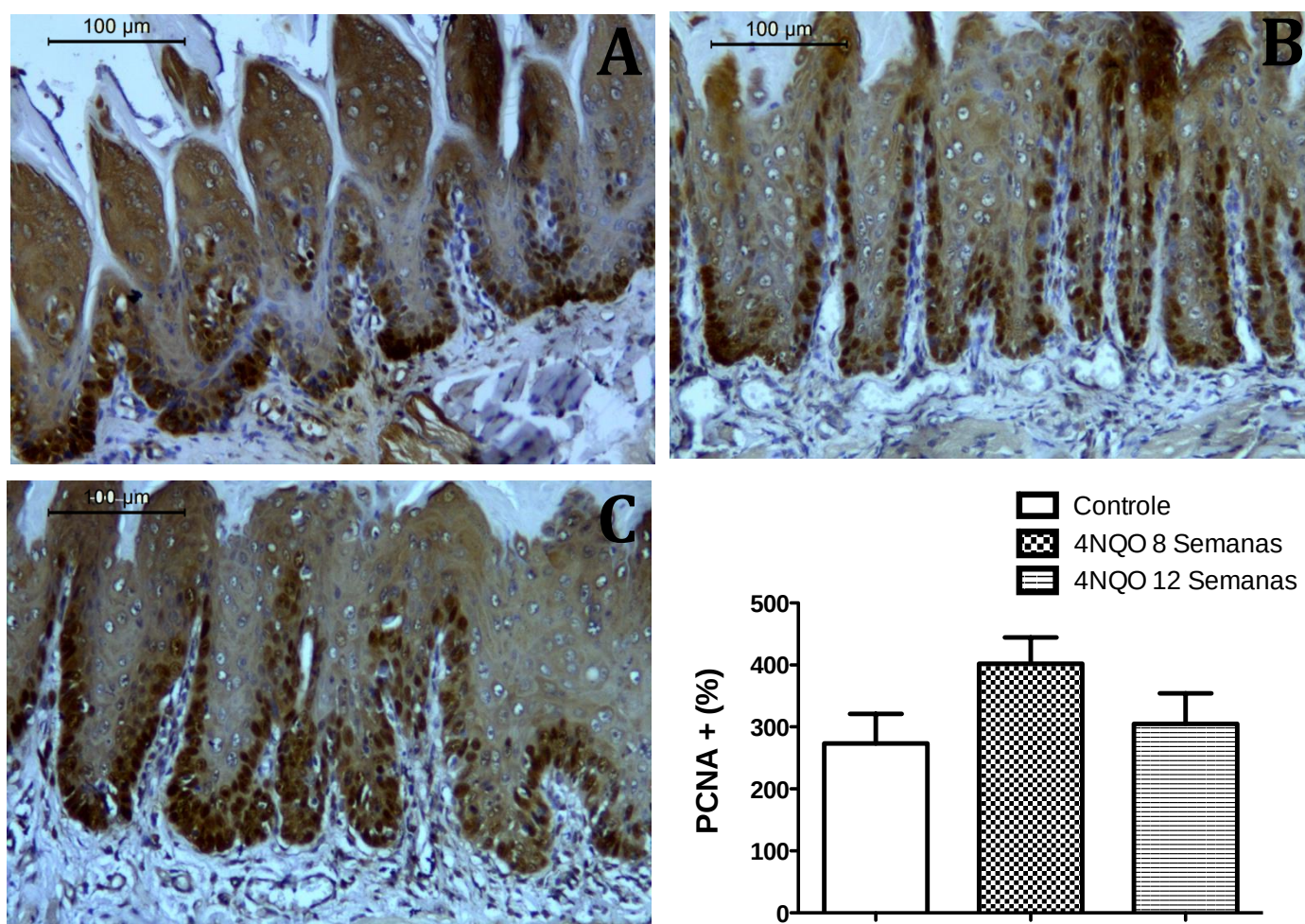


Figura 7 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo Bcl-2 em região posterior da língua. O grupo controle é representado pela imagem **A**, e as imagens **B** e **C** representam os grupos submetidos à carcinogênese pelos períodos de 8 e 12 semanas, respectivamente. Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle)

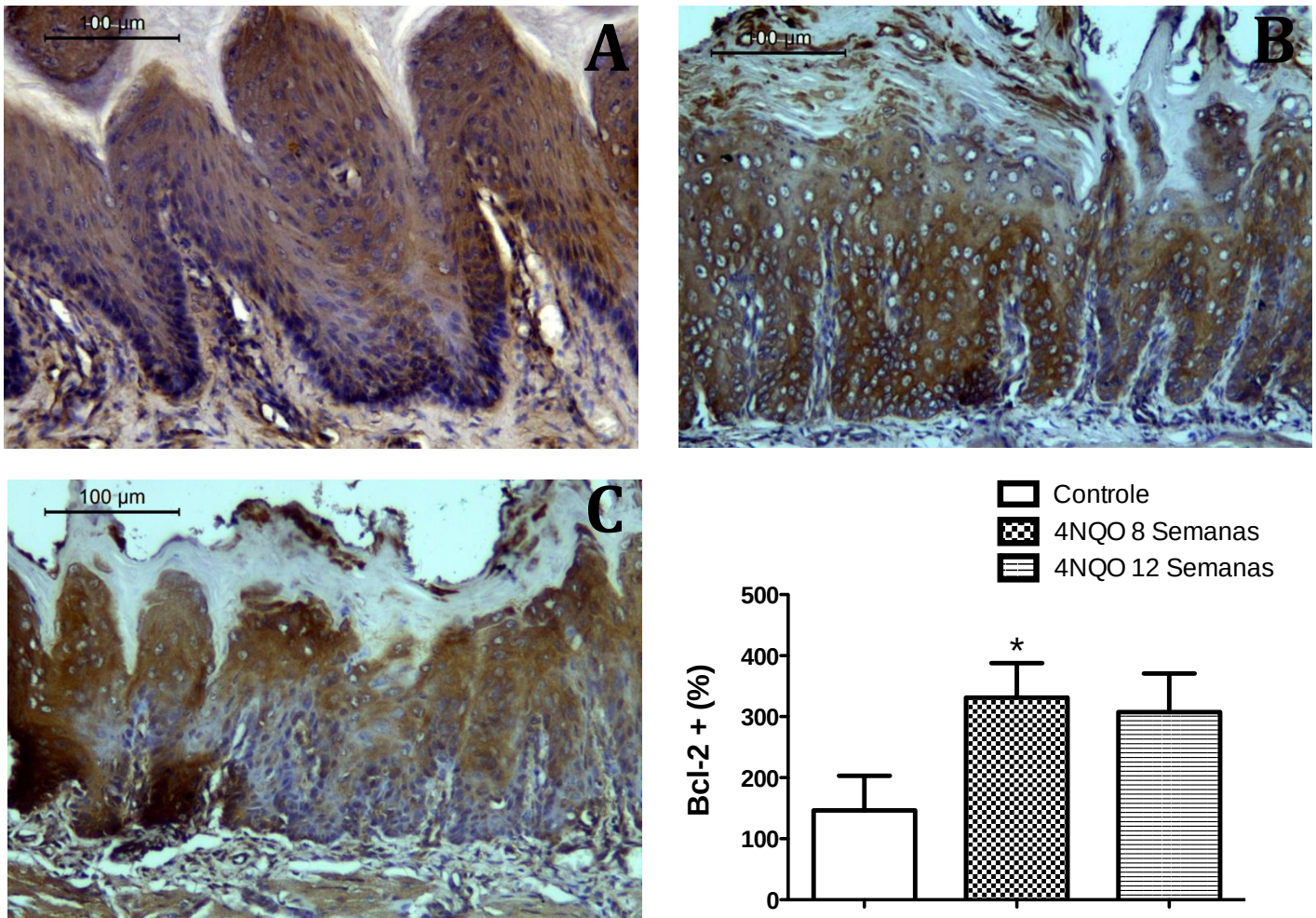


Figura 8 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS1 em região posterior da língua. O grupo controle é representado pela imagem **A**, e as imagens **B** e **C** representam os grupos submetidos à carcinogênese pelos períodos de 8 e 12 semanas, respectivamente. Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle)

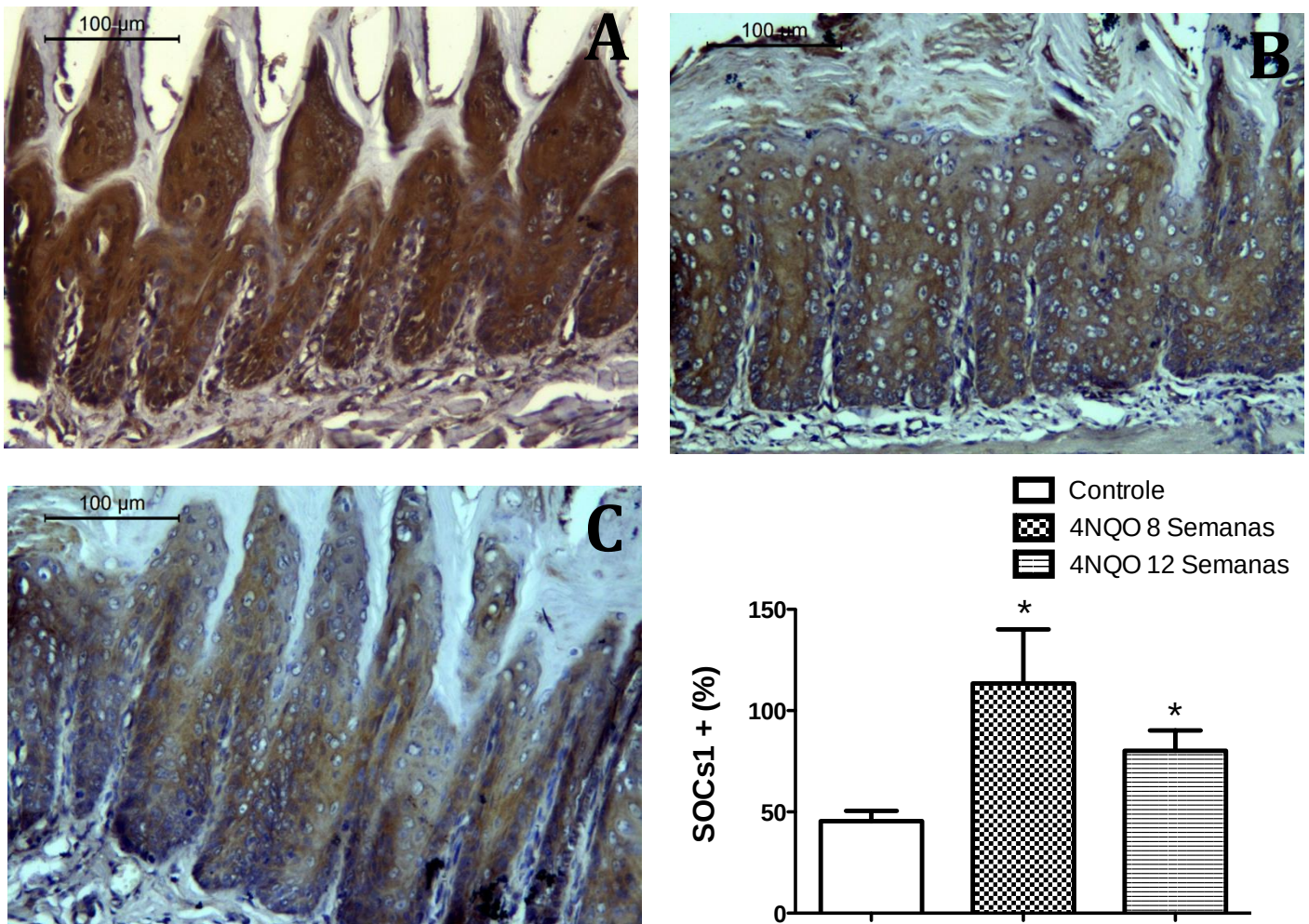


Figura 9 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo SOCS3 em região posterior da língua. O grupo controle é representado pela imagem **A**, e as imagens **B** e **C** representam os grupos submetidos à carcinogênese pelos períodos de 8 e 12 semanas, respectivamente. Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle)

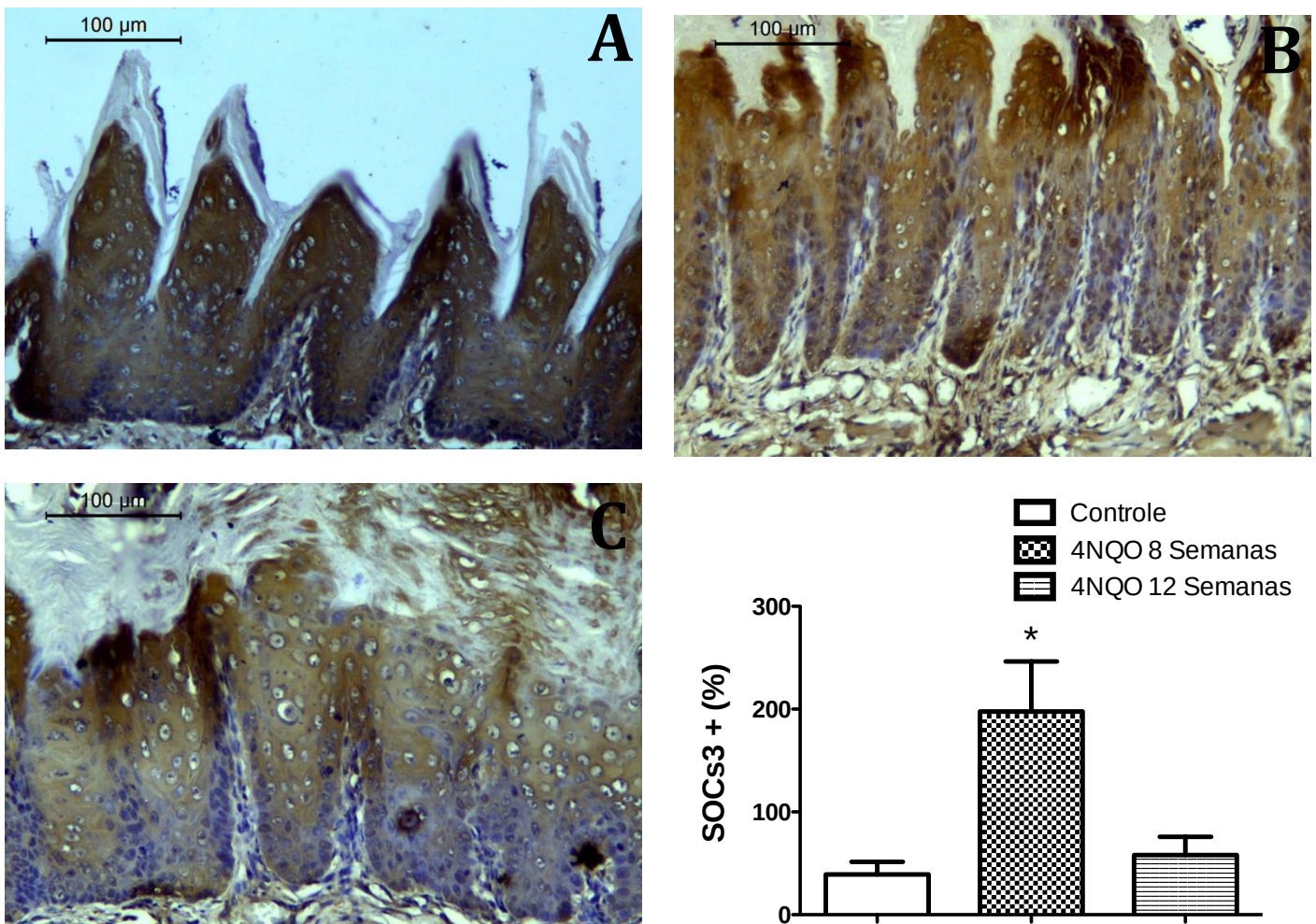
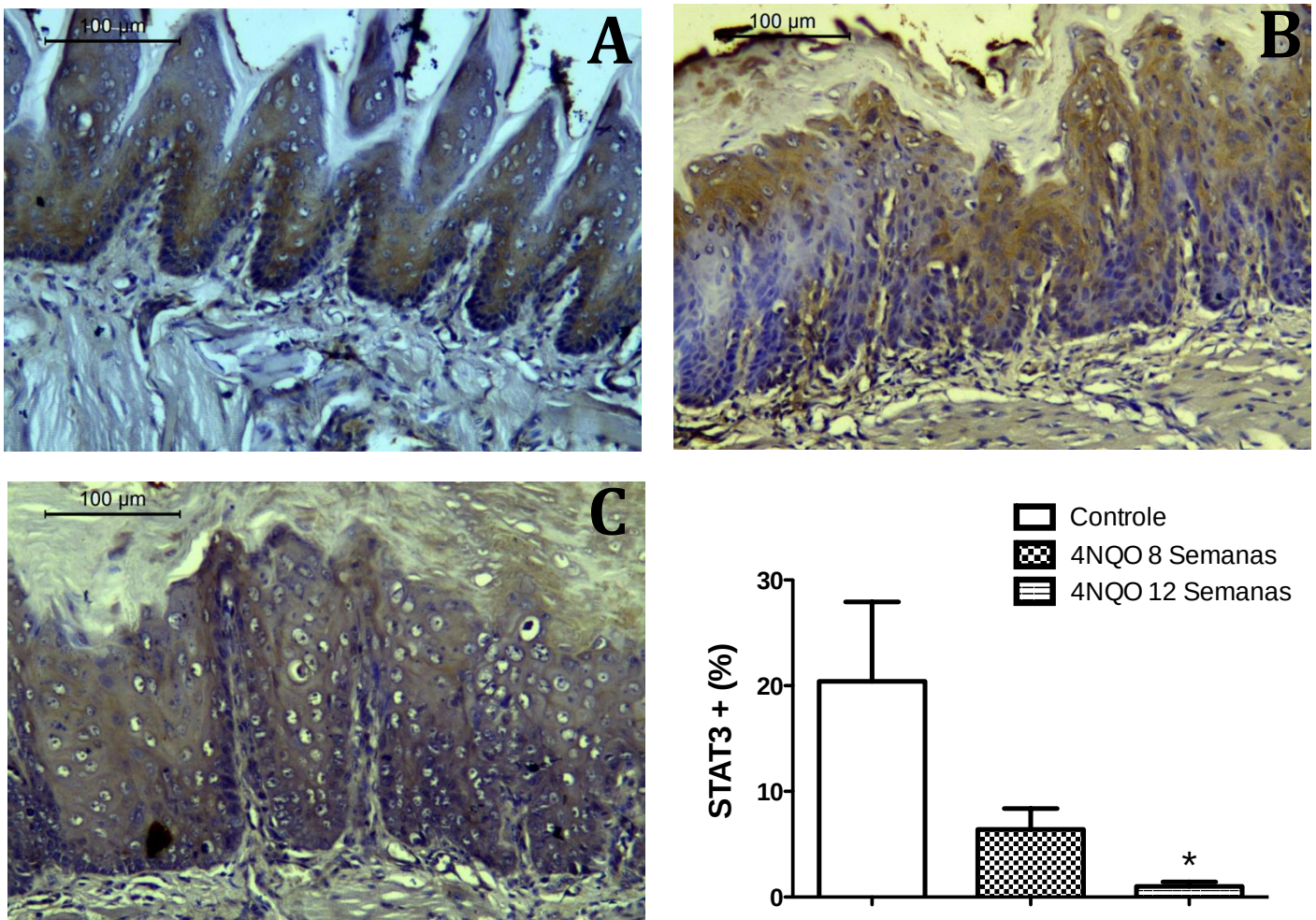


Figura 10 – Fotomicrografias evidenciando a marcação pelo anticorpo STAT3 em região posterior da língua. O grupo controle é representado pela imagem **A**, e as imagens **B** e **C** representam os grupos submetidos à carcinogênese pelos períodos de 8 e 12 semanas, respectivamente. Reação de imunohistoquímica x40. Gráfico representativo da expressão do anticorpo. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle)



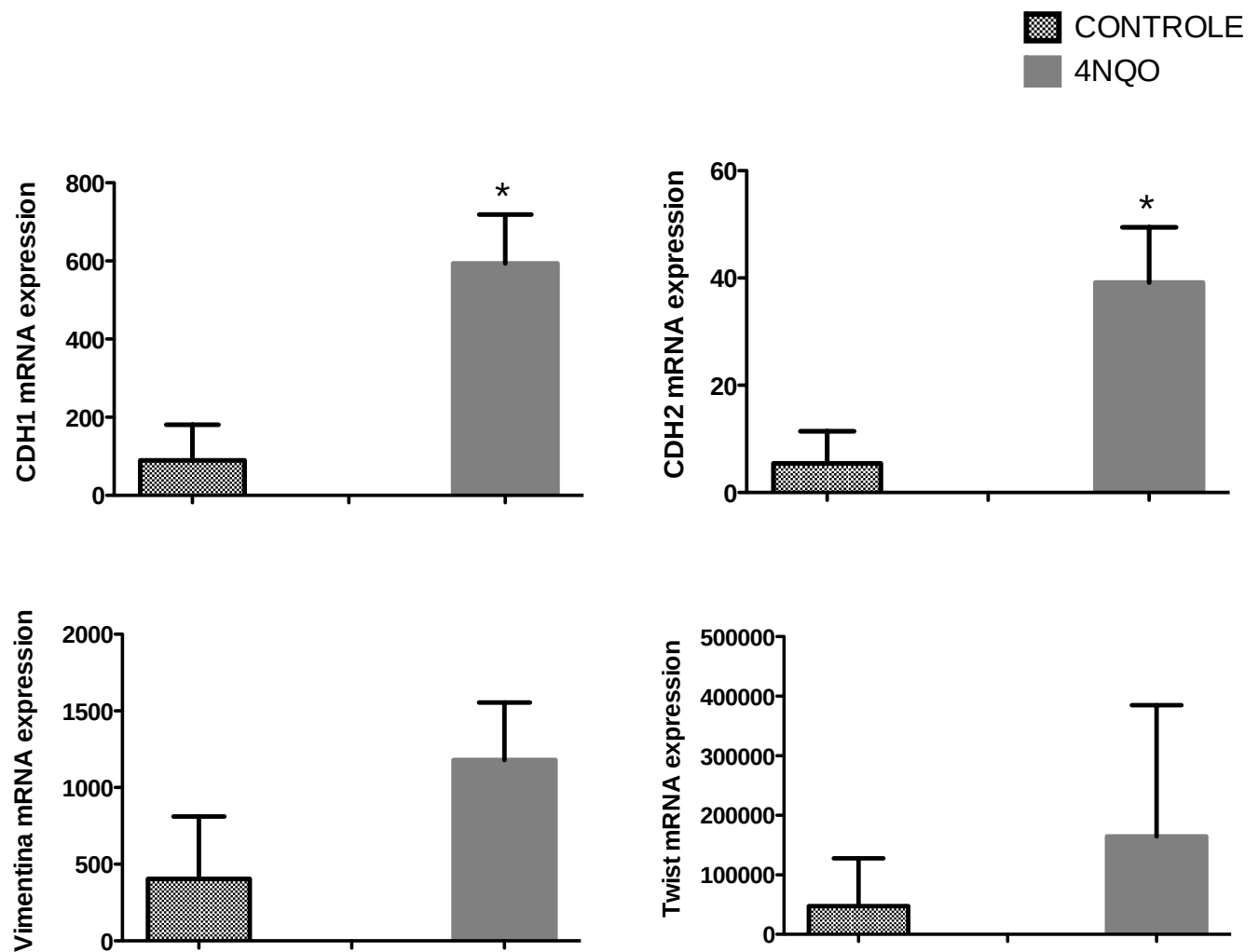
5.5 PCR em tempo real

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

Observou-se que a expressão do gene *Cdh2* foi significativamente aumentada após o tratamento com 4-NQO, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Da mesma forma, a expressão de *Cdh1* apresentou-se elevada após o tratamento com 4-NQO em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

A expressão de *Vimentina* e *TWIST1* foi aumentada após o tratamento com 4-NQO em relação ao controle negativo, porém não de forma significativa ($p > 0,05$). (Figura 11)

Figura 11 – Gráficos representativos da expressão gênica, por RT-qPCR, para as amostras referentes ao período experimental de 12 semanas. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle)





DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O 4-NQO é considerado um carcinógeno rotineiramente utilizado no estudo da carcinogênese bucal em ratos. De modo geral, o 4-NQO é usado por aplicação tópica ou administrado na água de beber (Nishimura ³¹ 1999; Henriques et al. ¹⁷, 2011; Nogutti et al. ³², 2012; Noguti et al. ³³, 2013). A forma de administração e dose de 4-NQO utilizada no presente trabalho foram baseadas em trabalhos anteriores, os quais demonstram ser bem toleradas e farmacologicamente ativas na indução de câncer oral em ratos (Ribeiro et al. ⁴⁴, 2005; Ribeiro et al. ⁴⁵, 2007; Noguti et al. ³², 2012). Alguns trabalhos administram a solução de 4-NQO através de pincelamento diário na região posterior da língua, o que poderia a nosso ver, estabelecer outras variáveis científicas que não aventadas no presente trabalho poderiam interferir nos presentes resultados, como por exemplo, o estresse. Devemos enfatizar que a via de administração que utilizamos nesse experimento assim como os períodos experimentais, não comprometeram o desenvolvimento dos animais. Entretanto, avaliação das funções hepáticas, renais ou mesmo as análises histopatológicas desses órgãos não foram realizadas nesse trabalho. De modo geral os trabalhos que utilizam o 4-NQO como protocolo em modelos animais têm como principal objetivo a indução de tumores bem estabelecidos (Kaplan et al. ²¹, 2002; Mognetti et al. ²⁶, 2006; Sioga et al. ⁵⁰, 2006; Henriques et al. ¹⁷, 2011). No presente trabalho, as displasias epiteliais estavam estabelecidas 8 semanas após o início do tratamento com o carcinógeno, confirmando alguns trabalhos anteriores que foram desenvolvidos em ratos, porém não foram observadas alterações nas semanas que antecederam esse período. É interessante salientar que a incidência de alterações linguais utilizando o modelo experimental do presente trabalho foi de 100%, confirmando os resultados descritos por Nishimura ³¹ (1999) e Noguti et al. ³² (2012).

Todos os ratos do grupo controle utilizados no presente trabalho foram sacrificados no início do experimento. O sacrifício do grupo controle no início do experimento, foi determinado baseando-se em trabalhos clássicos de Vered et al.⁶³ (2007) e Noguti et al.³² (2012) que sacrificaram os animais no início do período experimental, enquanto que Zhao et al.⁷⁵ (2013) utilizaram o mesmo protocolo experimental, entretanto, os ratos do grupo controle não foram sacrificados no início do experimento e foram tratados apenas com o veículo de diluição do 4-NQO, no caso a água, e não foram observadas nenhum tipo de alteração nas línguas dos ratos. Portanto, podemos aventar a hipótese de que o veículo utilizado para a diluição do 4-NQO não tem potencial para induzir alterações neoplásicas em ratos não tratados com 4-NQO. Também podemos hipotizar que sacrificando os animais do grupo controle no início do experimento, mantêm-se todas as características morfológicas normais dos tecidos a serem estudados com esse protocolo. Entretanto temos que considerar que a importância da presença de grupos controle não podem ser sub-estimados.

Os resultados do presente trabalho também confirmam que a localização da língua escolhida para ser analisada é imprescindível. De fato, a localização ou a região analisada da língua pode ser referencial e específica para avaliação do efeito do 4-NQO. Sugere-se, portanto, que o desenvolvimento de lesões na região posterior da língua verificado nesse e em outros trabalhos, quando comparado a outras regiões, se deva a maior tempo e área de contato do carcinógeno durante a deglutição (Henriques et al.¹⁷ 2011).

Os resultados na avaliação qualitativa da região posterior da língua, confirmaram os achados de trabalhos anteriores, mostrando presença de atipias celulares e displasia epitelial após 8 e 12 semanas de tratamento com 4-NQO. O agravamento das alterações microscópicas foi proporcional ao aumento do tempo experimental, resultados estes confirmados pelos dados obtidos pelo H-score. Análise quantitativa feita por H-score, como utilizado no presente trabalho, dentro das vantagens de suas informações, é amplamente

utilizada em investigações científicas, contribuindo e confirmando de forma efetiva os achados qualitativos, o que certamente proporciona segurança e melhor entendimento dos processos patológicos. Muitas vezes, a análise qualitativa de um processo patológico não permite extrair conclusões firmes a respeito de elementos numéricos, que só podem ser obtidos mediante estudos quantitativos. A similaridade deste trabalho com os demais acontece nos períodos de tratamento por 12 semanas, visto que, alguns autores não observam significantes alterações epiteliais nos períodos de tratamento mais curtos, isto é, anteriores a 8 semanas.

No sentido de abordar e validar o diagnóstico laboratorial na fase inicial da carcinogênese, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para detecção de imunomarcadores que possam apresentar significado prognóstico e terapêutico nessa fase. PCNA, Bcl-2, SOCS1 e -3, e STAT3 foram avaliados, considerando-se o papel de cada uma dentro da carcinogênese. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), genes reguladores de apoptose (Bcl-2), genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS), genes transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT), além dos biomarcadores Vimentina, Cdh1 e Cdh2, e TWIST1 são exemplos de proteínas envolvidas na carcinogênese de forma geral, possivelmente atuando na transformação de lesão pré-maligna oral em maligna (Feng et al.¹³, 2013; Ohara et al.³⁶, 2013; Placzek et al.³⁹, 2010; Rong et al.⁴⁶, 2013; Wang et al.⁶⁵, 2013).

A imunopositividade para PCNA, antígeno nuclear associado à proliferação, que é específico para as células nas fases ativas do ciclo celular (De Biasio et al.¹⁰, 2013), foi encontrada apenas nas células da camada basal e parabasal do epitélio normal, enquanto nas displasias a marcação era evidente também nas células das camadas espinhosa e superficial, o que está de acordo com outros estudos (Faria et al.¹², 2006; Silva et al.⁴⁹, 2007). Verificou-se ainda, que qualitativamente após 12 semanas de tratamento com 4-NQO a imunomarcação era

mais exuberante. Essa observação foi confirmada pelos maiores valores obtidos pelo H-score. Tais resultados estão de acordo com outros trabalhos que utilizam o 4-NQO para indução de CEC em ratos (Kaplan et al.²¹, 2002; Silva et al.⁴⁹, 2007; Moon et al.²⁷, 2012).

A positividade dos demais anticorpos analisados, com exceção do STAT3, também foi aumentada em ambos os períodos experimentais. Observou-se que a expressão de Bcl-2 foi elevada após o tratamento com 4-NQO, como verificado por Nishimura³¹ (1999), que também utilizou da mesma metodologia do presente trabalho estudando a carcinogênese. Este aumento representa a sobrevivência das células com ciclo celular alterado e manutenção da proliferação celular desordenada, traduzindo-se por inibir a apoptose e logicamente contribuindo na progressão do processo de carcinogenicidade (Adams, Cory¹, 2007). No presente trabalho, a imunomarcação de SOCS1 manteve-se aumentada após 12 semanas de tratamento com 4-NQO. Esses resultados estão parecidos com os achados Raccurt et al.⁴¹ (2003). Pode-se interpretar o aumento dessa positividade com a resistência na transformação de uma célula normal em neoplásica, como citado por Cooper et al.⁸ (2010). Apesar de aumentada a imunomarcação de Bcl-2 após 12 semanas, essa elevação foi menor que no período de 8 semanas, possivelmente devido à atividade de SOCS1 que apresentou maior imunopositividade após 12 semanas, correspondendo ao descrito por Cooper et al.⁸ (2010) que demonstram em seu trabalho a indução de apoptose por SOCS1, e portanto promovendo a redução de Bcl-2. Contrário aos resultados para SOCS1, a imunopositividade para SOCS3 foi reduzida após 12 semanas de tratamento com 4-NQO quando comparado aos valores obtidos no período de 8 semanas. Embora utilizando protocolos experimentais distintos, os resultados do presente trabalho vão ao encontro com os resultados obtidos por Rossa Jr et al.⁴⁷ (2012) que avaliaram a imunomarcação de SOCS3 em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e observaram significativa redução da proteína nos estágios iniciais da carcinogênese. Confirmando esses achados Ohara et al.³⁶ (2013) analisaram a imunomarcação de SOCS3

em diversos tipos de câncer, confirmando sua participação nos eventos precoces do processo carcinogênico. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura, o que significa que a redução da positividade de SOCS3 e o aumento de SOCS1 são inversamente proporcionais ao tamanho do tumor. Portanto, de forma semelhante à SOCS3, a proteína SOCS1 pode influenciar a transdução de sinais proliferativos através da regulação STAT atuando na sobrevivência, diferenciação e transformação celular como descrito por Cooper et al.⁸, (2010). Esta atividade é reforçada ao observar-se a expressão de STAT3, que no presente trabalho foi reduzida, possivelmente associada à modulação de SOCS, especificamente SOCS3, estando sua ativação relacionada à excessiva expressão de unidades oncogênicas que conduzem à proliferação e metástases como demonstra Wang et al.⁶⁵ (2013), sendo sua expressão diretamente proporcional ao desenvolvimento do tumor.

Concomitante à ocorrência desses eventos, observamos também, por avaliação de RNAm a expressão de Cdh1 e 2, Vimentina e TWIST1, genes envolvidos na progressão do processo carcinogênico por participarem no mecanismo de transição da célula epitelial para mesenquimal, onde as células epiteliais perdem suas características e adquirem propriedades mesenquimais tornando-se móveis e com capacidade de invasão (Rho et al.⁴², 2009; Zhang et al.⁷³, 2013). Os resultados demonstraram elevado nível de expressão de Cdh2, Vimentina e TWIST1, caracterizando de fato a progressão da carcinogênese, como já descrito na literatura (Liu et al.²³, 2010; Silva et al.⁴⁸, 2012; Zhang et al.⁷³, 2013). É interessante notar que esse aumento foi estatisticamente significativo em relação ao controle, apenas na expressão de Cdh2, sugerindo que a ocorrência de transição das células epiteliais em mesenquimais foi expressiva, o que permite considerar potencial processo de malignização. Paralelamente, verificamos também o aumento de Vimentina e TWIST1, porém de modo não significativo; o que representa e acompanha as modificações observadas na avaliação histopatológica, as quais não apresentaram aspectos de invasão celular devido abranger os estágios iniciais da

carcinogênese. Ainda, observamos aumento significativo de Cdh1; quando o curso e progressão do processo carcinogênico são caracterizados pela diminuição desse gene, que reduzido promove a perda de adesão entre as células proporcionando o mecanismo de transição da célula epitelial em mesenquimal, o que é relatado por diversos trabalhos (Zhang et al.⁷³, 2013; Yang et al.⁶⁷, 2014). E apesar desse dado não estar de acordo como implícito na literatura, pode ser explicado pelas observações de Liu et al.²⁴ (2014), que também demonstraram o aumento de Cdh1 em amostras teciduais de câncer, decorrente da baixa regulação da molécula alpha4, sugerindo o potencial papel dessa molécula no controle da migração e/ou invasão celular através da modulação da expressão de Cdh1.

De forma geral, a expressão das proteínas e genes avaliados é pertinente às alterações histopatológicas observadas, representando de forma adequada os estágios da carcinogênese. Ainda, pode-se afirmar o potencial de malignização das lesões pré-neoplásicas, representadas pelas displasias em seus variados graus, que mesmo não demonstrando características histopatológicas condizentes com processo maligno estabelecido, apresentam risco iminente de progressão e invasão decorrente das alterações subcelulares ocorrendo de forma concomitante. Entretanto, estudos futuros são sugeridos, considerando-se a ampla ocorrência de vias implicadas nos eventos moleculares da carcinogênese, e que podem atuar e modular de formas distintas esse processo.



CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. As alterações teciduais observadas nos períodos experimentais confirmam a propriedade do 4-NQO no desenvolvimento da carcinogênese.
2. Os biomarcadores PCNA, Bcl-2, SOCS1, SOCS3, Cdh1, Cdh2 e Vimentina, estão aumentados nas displasias epiteliais induzidas pelo 4-NQO, sugerindo que estes participam nas etapas iniciais da carcinogênese.
3. Os biomarcadores STAT3 e TWIST1 estão envolvidos nas displasias epiteliais severas.
4. Os genes e proteínas avaliados podem atuar como preditores na transformação dos períodos iniciais da carcinogênese.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26(9): 1324–37.
2. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*. 1985; 41(3): 899-906.
3. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000; 19(21): 2474–88.
4. Brasileiro Filho G, Guimarães RC, Bogliolo L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo: patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
5. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell*. 1999; 98(3): 295–303.
6. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(4): 945–54.
7. Calò V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2003; 197(2): 157–68.
8. Cooper JC, Shi M, Chueh FY, Venkitachalam S, Yu CL. Enforced SOCS1 and SOCS3 expression attenuates Lck mediated cellular transformation. *Int J Oncol*. 2010; 36(5): 1201-8.
9. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science*. 1997; 277(5332): 1630-5.
10. De Biasio A, Blanco FJ. Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer?. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2013; 91: 1-36.
11. Domenico DI M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, DE Rosa A, et al. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011; 31(12): 4211-8.
12. Faria PR. Carcinogênese bucal induzida pelo 4-NQO em língua de camundongos Knockout para o gene da galectina-3 [tese de doutorado]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2006.

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

13. Feng Z, Gan H, Cai Z, Li N, Yang Z, Lu G, et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1a, TWIST and E-cadherin is associated with aggressive tumor phenotypes in endometrioid endometrial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2013; 43(4): 396–403.
14. Fracalossi AC, Comparini L, Funabashi K, Godoy C, Iwamura ES, Nascimento FD, et al. Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(4): 325–33.
15. Fujino H, Chino T, Mai T. Experimental production of labial and lingual carcinomas in hamsters by local application of 4-nitroquinoline n-oxide. *Nat Cancer Inst*. 1965; 35(6): 907-18.
16. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29(8): 3049–52.
17. Henriques ACG, Cazal C, Lins RC, de Castro JFL. Análise morfológica da mucosa oral de ratos submetida à carcinogênese pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). *Pesq Bras Odontoped Clín Integr*. 2011; 11(1): 13-20.
18. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *TIBS*. 2000; 25(10): 496–502.
19. Jablons DM, He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, et al. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(24): 14133-8
20. Kanojia D, Vaidya MM. 4–Nitroquinoline–1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006; 42(7): 655-67.
21. Kaplan I, Hochstadt T, Dayan D. PCNA en lesiones displásicas de la mucosa de la lengua y del paladar inducidas por aplicación tópica de 4NQO en ratas desalivadas. *Med Oral*. 2002; 7(5): 336-43.
22. Kumar, Abbas V, Aster AK, Jon C. Robbins, *patologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro : Elsevier; 2013.
23. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010; 23(2): 213–24.
24. Liu GL, Yang HJ, Liu T, Lin YZ. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming growth factor-B1 and Twist in prostate cancer. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7(1): 76-82.

25. Loyola AM, Sant'ana JMA, Mendonça DF, Chammas R, Nonogaki S, Cardoso SV et al. Galectin-3 and beta-catenin expression in premalignant and carcinomatous lesions in tongue of mice. *J Bras Patol Med Lab*. 2011; 47(1): 49-56.
26. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006; 42(5): 448-60.
27. Moon SM, Ahn MY, Kwon SM, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH. Homeobox C5 expression is associated with the progression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41(6): 470 – 6.
28. 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(1 Pt 1): 53–8.
29. Neuwirt H, Pühr M, Santer FR, Susani M, Doppler W, Marcias G et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is expressed in human prostate cancer and exerts growth-inhibitory function through down-regulation of cyclins and cyclindependent kinases. *Am J Pathol*. 2009; 174(5): 1921–30.
30. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen JI, Van der Kogel JA, Kaanders HAMJ, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol*. 2011; 99(3): 344–8.
31. Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res*. 1999; 78(6): 1264–9.
32. Noguti J, Carvalho JG, da Silva VH, Dedivitis RA, Franco M, Ribeiro DA. Alkylation-induced genotoxicity as a predictor of DNA repair deficiency following experimental oral carcinogenesis. *J Mol Histol*. 2012; 43(2): 145-50.
33. Noguti J, Alvarenga TA, Andersen ML, Tufik S, Oshima CT, Ribeiro DA. The influence of sleep deprivation on expression of apoptosis regulatory proteins p53, bcl-2 and bax following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Dent Res J*. 2013; 10(2): 247-53.
34. Ochiai E, Sei SJ. Carcinogenic actions of 4 nitroquinoline N-oxide. *J Pharmac Soc. Japan*. 1945; 65(2): 18.
35. Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, et al. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2006; 131(1): 179–93.
36. Ohara KI, Kondo T, Ito M, Yoshimura A. SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT*. 2013; 2(3): e24053.

37. Ohne M, Omori K, Kobayashi A, Sakurada Y, Sekigawa K, Mochizuki A. Induction of squamous cell carcinoma in the oral cavity of rats by oral administration of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in drinking water. A preliminary report. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1981; 22(2): 85-98.
38. Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002; 38(6): 562–73.
39. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JD, Pelliccia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e40. doi: 10.1038/cddis.2010.18.
40. Punchihewa C, Inoue A, Hishiki A, Fujikawa Y, Connelly M, Evison B, et al. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. *J Biol Chem.* 2012; 287(17): 14289–300.
41. Raccurt M, Tam SP, Lau P, Mertani HC, Lambert A, Garcia-Caballero T. Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89(3): 524 – 32.
42. Rho JK, Choi YJ, Lee JK, Ryoo BY, Na II, Yang SH, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer.* 2009; 63(2): 219–26.
43. Ribeiro DA, Favero SDM, da Silva RN, Ribeiro DB, Alencar ME. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline-1- oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2004; 40(9): 910–5.
44. Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J ExpPathol.* 2005; 86(6): 375–81.
45. Ribeiro DA, Salvadori DM. Gingival changes in wistar rats after oral treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Eur J Dent.* 2007; 1(3): 152-7.
46. Rong Z, Li L, Fei F, Luo L, Qu Y. Combined treatment of glibenclamide and CoCl₂ decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013; 32:32. doi: 10.1186/1756-9966-32-32.
47. Rossa C Jr, Sommer G, Spolidorio LC, Rosenzweig SA, Watson DK, Kirkwood KL. Loss of expression and function of SOCS3 is an early event in HNSCC: altered subcellular localization as a possible mechanism involved in proliferation, migration and invasion. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45197. doi: 10.1371/journal.pone.0045197.

48. Silva BSF, Yamamoto FP, Pontes FSC, Cury SEV, Fonseca FP, Pontes HAR, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17(1): 29-34.
49. Silva RN, Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Placental glutathione Stransferase correlates with cellular proliferation during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Toxicol Pathol*. 2007; 59(1): 61–8.
50. Sioga A, Economou L, Kaklamanos EG, Antoniadis V, Keramidas G, Manthos A, et al. Ultrastructural changes of the palatal mucosa following application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in rats subjected to major salivary gland excision. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(4): 487-98.
51. Smith CJ, Pindborg JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. Copenhagen: C. Hamburger; 1969.
52. Song XT, Evel-Kabler K, Rollins L, Aldrich M, Gao F, Huang XF, Chen SY. An alternative and effective HIV vaccination approach based on inhibition of antigen presentation attenuators in dendritic cells. *PLoS Med*. 2006; 3(1): e11.
53. Stleider NE, Reade PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinoline-1 oxide. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*. 1984, 57(5): 524-31.
54. Svensson S, Heyden G. Experimental induction of irreversible precancerous changes in the palatal epithelium of the rat. *Int J Oral Surg*. 1982; 11(1): 52-8.
55. Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-Nitroquinoline 1-oxide induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2002; 23(8): 1361-7.
56. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(1): 301-13.
57. Trengove MC, Ward AC. SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol*. 2013; 2(1): 1-29.
58. Tsao JT, Kuo CC, Lin SC. The analysis of CIS, SOCS1, SOSC2 and SOCS3 transcript levels in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Med*. 2008; 8(4): 179-85.
59. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985; 228(4706):1440-3.

60. Van Der Waal I, Schepman KP, Van Der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997; 33(5): 291-301.
61. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335(6189): 440-2.
62. Vered M, Daniel N, Hirshberg A, Dayan D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2003; 39(5): 491–6.
63. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol.* 2007; 43(10): 999-1006.
64. Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy.* 1973; 24(1): 39-48.
65. Wang Y, Boxel-Dezaire A, Cheon H, Yang J, Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(42): 16975–80.
66. Xie F, Li K, Ouyang X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin Exp Metastasis.* 2009; 26(8): 1025-32.
67. Yang WN, Ai ZH, Wang J, Xu YL, Teng YC. Correlation between the overexpression of epidermal growth factor receptor and mesenchymal markers in endometrial carcinoma. *J Gynecol Oncol.* 2014; 25(1): 36-42.
68. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18(1): 143-64.
69. Yuan B, Oechsli MN, Hendler FJ. A region within murine chromosome 7F4, syntenic to the human 11q13 amplicon, is frequently amplified in 4NQO induced oral cavity tumors. *Oncogene.* 1997; 15(10): 1161–70.
70. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology.* 2007; 50(5): 648-58.
71. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11): 798–809.
72. Zhang J, Li H, Yu JP, Wang SE, Ren XB. Role of SOCS1 in tumor progression and therapeutic application. *Int J Cancer.* 2012; 130(9): 1971-80.
73. Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-Cadherin Expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in

- erlotinib-resistant lung cancer cell lines. PLoS ONE. 2013; 8(3): e57692. doi: 10.1371/journal.pone.0057692
74. Zhao H, Ho PC, Lo YH, Espejo A, Bedford MT, Hung MC et al. Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA Damages in breast cancer. PLoS One. 2012; 7(1): 2941-6.
75. Zhao J, Wang Z, Han J, Qiu X, Pan J, Chen J. Increased frequency of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ cells correlates with the progression of 4-nitroquinoline1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Clin Oral Investig. 2013 Nov 22. [Epub ahead of print]





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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 14/2012

Araraquara, 26 de Outubro de 2012

Senhores Pesquisadores:

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

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao

Prof. Dr. LUÍS CARLOS SPOLIDÓRIO

DD. Pesquisador Responsável

a/c Adriana Cabrera Ortega e Vinícius de Paiva Gonçalves

Departamento de Fisiologia e Patologia

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

Araraquara, 10 de março de 2014.

ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA