

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/09/2018.



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP)  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Área de Concentração: Estomatologia



## **VITOR BONETTI VALENTE**

**Níveis dos hormônios do estresse no  
microambiente: influência sobre a ocorrência  
do tumor e modulação durante a carcinogênese  
quimicamente induzida em ratos**



**Araçatuba - SP**

**2016**

**VITOR BONETTI VALENTE**

**Níveis dos hormônios do estresse no  
microambiente: influência sobre a ocorrência  
do tumor e modulação durante a carcinogênese  
quimicamente induzida em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de  
Araçatuba - Unesp, para obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” –  
Área de Concentração Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

**Araçatuba - SP**

**2016**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V154n Valente, Vitor Bonetti.  
Níveis dos hormônios do estresse no microambiente:  
influência sobre a ocorrência do tumor e modulação durante  
a carcinogênese quimicamente induzida em ratos / Vitor  
Bonetti Valente. - Araçatuba, 2016  
101f. ; il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé

1. Neoplasias 2. Carcinogênese 3. Estresse fisiológico  
4. Norepinefrina 5. Corticosterona 6. Hormônio adrenocorti-  
cotrópico 7. Fator neurotrófico derivado do encéfalo 8. Neo-  
plasias de cabeça e pescoço I. Título

Black D6  
CDD 617.63

## **DADOS CURRICULARES**

## **DADOS PESSOAIS**

VITOR BONETTI VALENTE

Nascimento.....: 12 de Maio de 1989

Ribeirão Preto/SP

Filiação.....: Vitor Valente Neto

Maria Neusa Bonetti Valente

## **DADOS CURRICULARES**

2009-2013      Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr - UNESP).

2012-2012      Curso de Aperfeiçoamento em Formação em Cirurgia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr - UNESP).

2014-2016      Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na Área de Estomatologia, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA - UNESP).

## **DEDICATÓRIA**

## **DEDICATÓRIA**

***Dedico este estudo...***

***...à todos os pacientes que vivem ou que já viveram  
a experiência de adoecer com o câncer...***



# **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

### **AGRADEÇO...**

À **Deus**, por me proporcionar a Sua paz e serenidade, essenciais para enfrentar e superar todos os desafios. Obrigado por me acompanhar em TODOS os momentos e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, **Vitor Valente** e **Maria Neusa**, pelo amor incondicional, zelo, amparo, carinho, dedicação, atenção e esforços voltados à minha formação religiosa, humana, ética e profissional. À eles, minha eterna gratidão e todo meu amor. Obrigado por me apoiarem na realização deste trabalho e na conclusão de mais uma etapa.

Às minhas irmãs caçulas que amo muito, **Ana Carolina** e **Ana Julia** pela atenção, companheirismo e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Muito obrigado por me presentear constantemente com a alegria contagiante que vocês duas têm, que deixa a vida bem mais “leve” quando podemos estar juntos.

Aos meus avós paternos, **Victor** e **Wilman**, e maternos, **Raeder** e **Clélia** (Mami), minha tia e madrinha **Clélia** (Tata), e meus **tios, tias, primos e primas**, todos sempre solícitos naquilo que melhor poderiam oferecer para me apoiar na busca dos meus sonhos e objetivos. Muito obrigado pelo incentivo de vocês.

Aos meus grandes companheiros, amigos de infância e irmãos “do peito”, **Pedro Peres, Leandro Pippa** e **Felipe Matioli**, que sempre acompanham meus

caminhos, torcem e vibram por mim. Obrigado por estarem ao meu lado em mais uma conquista, e por serem tão acolhedores nos meus retornos à Ribeirão Preto (SP) sempre que é possível realizar uma reunião da “máfia”.

À todos os amigos da **Turma 84**, formados pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr – UNESP), em especial, **Patrícia Lima, Welton Arita, Túlio Morandin, Rafael Piai, Vitor Racca, Sabrina Neri e Mônica Irma**, pelos momentos saudosos e pelas lembranças perpétuas das experiências vividas nos anos da graduação, e aos amigos **docentes e servidores** técnico-administrativos daquela instituição, em especial, das disciplinas de Diagnóstico Bucal e Estomatologia. A professora Dra. **Cláudia Maria Navarro**, minha primeira orientadora na área de diagnóstico bucal, com quem pude desenvolver meu trabalho de conclusão de curso (TCC) por meio do estágio de iniciação científica. Muito obrigado pelos estímulos que despertaram em mim grande interesse pela “vida acadêmica” e pelos anos de convivência e aprendizado. As professoras Dra. **Mirian Aparecida Onofre**, Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato** (diretora da FOAr – UNESP) e Dra. **Andreia Bufalino**, e a funcionária **Meire Pipoli** por toda ajuda, parceria, contribuição e aprendizado gerado nas atividades acadêmicas desenvolvidas nesses anos de convivência dentro da universidade, quanto pelos momentos de descontração e alegria fora dela.

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA – UNESP), representada pelos amigos e companheiros, diretor Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi** e vice-diretor Prof. Dr. **João Eduardo Gomes Filho**, ao programa de pós-graduação *stricto sensu*

em Odontologia, coordenado pelo Prof. Dr. **André Luiz Fraga Briso**, e à área de concentração em Estomatologia, coordenada com brilhantismo pelo amigo Prof. Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação na referida instituição de ensino.

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, representado pela chefe Profa. Dra. **Leda Maria Pescinini Salzedas**, vice chefe Prof. Dr. **Marcelo Macedo Crivelini** e pelas assessoras administrativas **Adriana de Paula** e **Silva Rahal Leal**, ao Departamento de Ciências Básicas, representado pela chefe Profa. Dra. **Doris Hissako Sumida**, vice chefe Profa. Dra. **Alaíde Gonçalves** e assessora administrativa **Eliseide Maria Navega**, e à empresa Merck Millipore Brasil, com sede em Barueri (SP), representada pelo Prof. Dr. **Matheus Corrêa Costa**, pelo fornecimento das instalações e infraestrutura para a realização dos experimentos idealizados para este estudo.

Aos excelentíssimos professores, Dr. **Éder Ricardo Biasoli**, Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, Dr. **Daniel Galera Bernabé** e Dra. **Kellen Cristine Tjioe**, e a funcionária **Marli dos Santos**, da disciplina de Estomatologia, e à todos os companheiros **docentes** e **servidores** técnico-administrativos do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica e do Departamento de Ciências Básicas pela convivência e amizade e pela parceria e disponibilidade.

Ao Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA – UNESP, supervisionado pelo professor Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, pelo acolhimento e oportunidade ímpar do aprendizado, tanto técnico-científico quanto pela troca de experiências humanas diversas junto aos pacientes que fazem ou que fizeram o tratamento

para o câncer. Aos servidores técnico-administrativos do COB, **Jane Fátima, Jefferson Teixeira, Janaína Zavitoski, Francisco Collado, Sebastião Neto, Suzy Freitas, Regiane Nogueira, Daniene Ribeiro, Anne Cocato e Gabrielle Duarte** pela disponibilidade, amizade, convívio diário, e pela ajuda nas diretrizes do tratamento oncológico e do recrutamento de pacientes para pesquisa.

Aos servidores técnico-administrativos que trabalham na Seção de Pós-Graduação da FOA - UNESP, **Lilian, Cristiane e Valéria** por toda ajuda, auxílio e colaboração prestados com muita eficiência e dedicação. Aos funcionários da biblioteca da FOA – UNESP, em especial, a **Ana Cláudia** pela atenção e ajuda imprescindível com a formatação deste trabalho.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. **Daniel Galera Bernabé**, docente da disciplina de Estomatologia, exemplo de caráter, ética e de comprometimento profissional na *busca incansável de um ideal*, pela oportunidade de desenvolver este trabalho de pesquisa. Pela sua orientação segura, com respeito, dedicação, paciência e tolerância, compreensão e disponibilidade. Agradeço, imensamente, todo apoio concedido. Muito obrigado pelo acolhimento, por confiar em mim, e também por todos os estímulos, fundamentais para que eu pudesse desenvolver um aprendizado ímpar no campo científico como pesquisador (“em formação”). Espero ter atendido e correspondido às suas expectativas e anseios. Gratidão e reconhecimento por tudo. TUDO.

À minha co-orientadora e amiga, Profa. Dra. **Sandra Helena Penha de Oliveira**, pela sua co-orientação, estímulos, confiança, disponibilidade, apoio e “gigantesco” suporte laboratorial (que permitiu o alojamento dos animais desta

pesquisa durante o período de carcinogênese bucal e a realização dos ensaios de PCR em tempo real e ELISA). Muito obrigado pela sua grande parceria e por toda colaboração.

Ao professor e médico veterinário Dr. **Paulo Sérgio Patto dos Santos** e a sua ex-aluna, orientada de doutorado, a médica veterinária Dra. **Joana Zafalon Ferreira**, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba (FMVA – UNESP), pelo suporte ambulatorial e auxílio com a anestesia dos animais para a realização das biópsias linguais. Aos médicos veterinários Dr. **Caio Galera Bernabé** (Clínica Veterinária CardioMais, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e Dr. **Fábio Nascimento Franco** (Clínica Veterinária Gaiavet, São José do Rio Preto, SP, Brasil) por esclarecerem minhas dúvidas em relação aos procedimentos anestésicos e farmacológicos preconizados para os animais que participaram desta pesquisa. Muito obrigado pela receptividade.

Ao professor Dr. **Matheus Corrêa Costa** (Merck S.A., Barueri, SP, Brasil) pelo grande auxílio com as dosagens dos hormônios pelo método de dosagem de múltiplos analitos. À professora Dra. **Ana Cláudia Stevanato Nakamune** por me ajudar com a dosagem de proteínas totais das amostras.

Aos professores e amigos Dra. **Ana Maria Pires Soubhia** e Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, pela disponibilidade e grande contribuição com a análise histopatológica do trabalho. Aos amigos e técnicos do laboratório de patologia, **José Marcelo Tramarin** (Gordo) e **Giseli Mitsuy Kayahara**, por me ajudar com a organização e também com o processamento histopatológico das lâminas. O método proposto por vocês funcionou muito bem comigo. Muito obrigado.

Ao professor Dr. **Luciano Tavares Ângelo Cintra** pela sua orientação na captura das imagens histopatológicas e medida microscópica da espessura dos tumores.

Às professoras Dra. **Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld** e Dra. **Marisa de Andrade** (Mayo Clinic, Rochester, MN, Estados Unidos) por contribuírem com a análise estatística do trabalho.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação em Estomatologia, **Flávia Verza** (Sister!!! Muito obrigado por me receber tão bem em Araçatuba e por estar sempre ao meu lado e me apoiando em todas as ocasiões!!!), **Lígia Lavezo**, **Gláucia Soares**, **Neliana Salomão**, **Maurício Fabiano**, **Ingrid Santos**, **Daniela Bastos**, **Bruna Sarafim**, **Ketelin Dal Pra**, **Aneliza Moraes**, **Jéssica Figueira** e **Saygo Tomo**, pelo convívio próximo nestes dois anos e meio de mestrado. Muito obrigado por estarem junto comigo caminhando para a reta final desta etapa, que reuniu incontáveis momentos de felicidade, porém também de dificuldades. Gratidão a cada um de vocês por todo carinho, atenção e apoio dispensados. Aos **amigos** da pós-graduação das demais áreas do programa de Odontologia pela torcida. Muito obrigado.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação e graduação que “habitam” o laboratório de Farmacologia, **Aline Satie Takamiya** (Alininha Pós-doc!!! Muito obrigado por todos os conselhos de “mãe” e também pelo apoio incondicional de sempre!!!), **Caril Amaral**, **Victor Balera** (Vitão!), **Carluci Beltran**, **Fernanda Demarqui**, **Simone Potje**, **Jéssica Troiano** e **Murilo Graton** (Murilão!) por me ajudarem nas dúvidas e dificuldades que encontrei no laboratório.

Aos meus queridos e estimados amigos da graduação, em especial, os estagiários da disciplina de Estomatologia, **Felipe Yudi** (Felipão! Muito obrigado pela ajuda, por ser meu “braço-direito” e enfrentar comigo todas as dificuldades encontradas na execução laboratorial deste trabalho!), **Lia Kobayashi**, **Daniella Cantieri**, **Jéssica Bugiga**, **Heitor Cecílio**, **Karla Zancan** e **Camila Moura** pela convivência e por me concederem a oportunidade diária de aprender com vocês. Às alunas **Isadora Victorino** e **Camila Nathiele** por me auxiliar nas biópsias linguais dos animais desta pesquisa e aos alunos **João Pedro**, **Karina Andrade**, **Camila Guerra** e **Lucas Seraphim** pela colaboração em atividades acadêmicas realizadas em conjunto.

Aos **animais** utilizados nesta pesquisa, que “doaram” a própria vida para a construção de um novo horizonte científico.

À **CAPES/DS** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudo concedida.

À **todas** as pessoas envolvidas que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.



**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

## EPÍGRAFE

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

**Francisco Cândido Xavier**

**RESUMO**

Valente VB. Níveis dos hormônios do estresse no microambiente: influência sobre a ocorrência do tumor e modulação durante a carcinogênese quimicamente induzida em ratos. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

## Resumo

Evidências mostram que os hormônios relacionados ao estresse podem influenciar a progressão do câncer, mas o papel destes mediadores sobre o processo de carcinogênese no microambiente tecidual, em condições naturais, é pouco compreendido. Neste estudo, nós utilizamos um modelo de carcinogênese bucal em ratos para testar a hipótese de que os níveis de hormônios relacionados ao estresse no microambiente tecidual em condições naturais (sem estresse) pré-indução carcinogênica influenciam a ocorrência e progressão do carcinoma espinocelular (CEC) de língua. Quarenta e oito ratos machos Wistar foram submetidos a uma biópsia de tecido lingual normal previamente à indução carcinogênica e os níveis teciduais de norepinefrina, corticosterona, ACTH e BDNF foram mensurados. Três semanas depois os animais foram tratados com o carcinógeno químico 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) por 20 semanas e a ocorrência de CEC ou Leucoplasia (lesão precursora do CEC) na língua foi analisada microscopicamente. Níveis basais aumentados pré-carcinogênese de norepinefrina e BDNF e níveis reduzidos de corticosterona foram preditivos para ocorrência de CEC. Níveis basais elevados de norepinefrina foram associados à uma expressão reduzida de RNAm para CDKN2a-p16 nos CECs. Níveis teciduais de corticosterona e BDNF nas leucoplasias e corticosterona no CEC foram significativamente mais elevados em relação a mucosa normal pré-carcinogênese. Níveis elevados de norepinefrina no microambiente dos CECs foram associados a um maior volume e espessura do tumor. Da mesma forma, níveis elevados de norepinefrina, ACTH e BDNF no CEC foram associados a uma menor intensidade do infiltrado linfoplasmocitário subjacente ao tumor. Além disso, maior expressão de RNAm para IL-6 no CEC foi correlacionada à níveis elevados de corticosterona pós-carcinogênese. Este estudo mostra as primeiras evidências in vivo de que os níveis basais de hormônios do estresse no microambiente do tecido normal podem ser preditivos para a incidência do câncer quimicamente induzido. Além disso, a ação do carcinógeno pode modular os níveis hormonais no microambiente tecidual e estes podem estar associados à progressão do tumor. Em suma, estes dados sugerem que a susceptibilidade ao início e progressão do carcinoma quimicamente induzido pode ser diretamente influenciada por diferenças individuais endócrinas no microambiente pré-carcinogênese.

**Palavras-chave:** Neoplasias, carcinogênese, estresse fisiológico, norepinefrina, corticosterona, hormônio adrenocorticotrófico, fator neurotrófico derivado do encéfalo, neoplasias de cabeça e pescoço

## **ABSTRACT**

Valente VB. Stress hormones levels in the microenvironment: influence on tumor occurrence and modulation during chemically induced carcinogenesis in mice.

[dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2016.

### **Abstract**

Evidence show that stress-related hormones may influence cancer progression, but their role in tissue microenvironment on the carcinogenesis is poorly understood. In this study, we have used an oral carcinogenesis model in rats to test the hypothesis that stress-related hormones levels in the tissue microenvironment in natural conditions pre-carcinogenic induction could influence the oral squamous cell carcinoma (OSCC) occurrence and progression. Forty-eight male Wistar rats were underwent to a normal tongue tissue biopsy before carcinogenic induction and tissue levels of norepinephrine, corticosterone, ACTH and BDNF were measured. Three weeks later the animals were treated with chemical carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) for 20 weeks and the OSCC or oral leukoplakia (non-cancerous lesions) occurrence into tongue was evaluated. Increased concentrations of norepinephrine and BDNF, and reduced corticosterone levels in the pre-carcinogen microenvironment were predictive for OSCC occurrence. Increased pre-carcinogen norepinephrine concentrations were associated to a CDKN2a-p16 mRNA lower expression in OSCCs. Tissue levels of corticosterone and BDNF in oral leukoplakia and corticosterone in OSCC were significantly higher than pre-carcinogenesis normal mucosa. Increased norepinephrine concentrations in OSCC microenvironment were associated to a higher tumor volume and thickness. Likewise, increased levels of norepinephrine, ACTH and BDNF in OSCC were associated to a lesser intensity of the lymphoplasmocytic infiltrate underlying to tumor. Furthermore, IL-6 mRNA enhanced expression was correlated to increased corticosterone levels post-carcinogenesis. This study shows the first *in vivo* evidence that pre-carcinogen stress hormones levels in the microenvironment of the normal tissue may be predictive for chemically induced cancer occurrence. Moreover, the carcinogen action can modulate hormonal levels in the tissue microenvironment, which can be associated to tumor progression. In short, these data suggest that the susceptibility to onset and progression of chemically induced carcinomas may be directly influenced by endocrine individual differences in pre-carcinogenesis microenvironment.

**Keywords:** Neoplasias, carcinogenesis, physiological stress, norepinephrine, corticosterone, adrenocorticotrophic hormone, brain-derived neurotrophic factor, head and neck neoplasias

## **LISTA DE FIGURAS**

## **LISTA DE FIGURAS**

Page 38

**Figure 1.** Illustrative representation of experimental design and study phases.

Page 41

**Figure 2.** Anesthetic induction. A. Rat inside of Induction-chamber. B. Loss of muscular tonus (animal in the ventral decubitus position). C. The rat was removed from induction-chamber and maintained under anesthesia with an adapted face mask.

Page 42

**Figure 3.** Tongue biopsy pre-carcinogenic induction. A. Normal tongue mucosa. B. Incision with a 4 mm circular manual punch. C. Removal of the fragment. D. Surgical wound. E. Sutures. F. Lingual mucosa fragment for laboratorial analyses.

Page 51

**Figure 4.** Clinical and histopathological features of oral leukoplakia and OSCC developed after chemically induced carcinogenesis by 4NQO (original magnification - 100x). (A) Small irregular yellowish-white plates. (B) Hyperplastic epithelium with mild dysplasia and hyperkeratosis. (C) Large heterogeneous white plate. (D) Moderate epithelial dysplasia with mild chronic inflammatory infiltrate. (E) Ulcerative lesion surrounded by few white areas. (F) Well-



differentiated OSCC with intense inflammatory infiltrate underlying to neoplastic area. (G) Extensive ulcerative lesion reaching half of the tongue. (H) Highly infiltrative well-differentiated OSCC.

Page 53

**Figure 5.** Simple linear regression analysis among pre-carcinogen norepinephrine (A), corticosterone (B), ACTH (C) and BDNF (D) concentrations, and oral leukoplakia and OSCC occurrence. Pre-carcinogen norepinephrine and BDNF levels in the tongue microenvironment predicted oral cancer ( $*p<0.05$ ). Student's test-t between stress-related hormones levels means pre-carcinogenic induction, which were used to produce respective bar graphs;  $*p<0.05$ .

Page 58

**Figure 6.** Student's test-*t* between pre- and post-carcinogen levels of norepinephrine (A), corticosterone (B), ACTH (C) and BDNF (D). Increased post-carcinogen corticosterone concentrations were found in the tumor and leukoplastic lesions ( $*p<0.05$ ). Higher post-carcinogen BDNF levels were found only in the leukoplastic lesions compared to pre-carcinogen normal mucosa;  $*p<0.05$ .

Page 59

**Figure 7.** Correlation analysis showing a positive correlation between pre-carcinogen stress-related hormones levels (A, C, E, G, I and K;  $*p<0.001$ ). A positive correlation was also observed in the post-carcinogen concentrations of

norepinephrine vs ACTH (D; \* $p < 0.001$ ), corticosterone vs ACTH (H; \* $p = 0.035$ )  
and ACTH vs BDNF (L; \* $p < 0.001$ ).

## **LISTA DE TABELAS**

## **LISTA DE TABELAS**

Page 54

**Table I.** Pre-carcinogen stress-related hormones in the tongue microenvironment and OSCC occurrence risk.

Page 56

**Table II.** Associations among pre-carcinogen stress-related hormones and clinicopathological variables and molecular features.

Page 61

**Table III.** Association among post-carcinogen stress-related hormones and clinicopathological variables and molecular features.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

11 $\beta$ HSD2 = 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II

4NQO = 4-nitroquinoline-1-oxide

ACTH = adrenocorticotropic hormone

AKT = protein kinase B

BDNF = brain-derived neurotrophic factor

C57BL6/J = C57 black 6/J

CA = California

cAMP = adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CDK-4 = cyclin-dependent kinase 4

CDK-6 = cyclin-dependent kinase 6

CDKN2A = cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid

CNS = central nervous system

Co. = company

COX-2 = cytochrome c oxidase subunit 2

CRF = corticotropin-releasing factor

CV = coefficient of variation

DNA = deoxyribonucleic acid

E-cadherin = epithelial cadherin

ECM = extracellular matrix

eg. = for example

EGF = epidermal growth factor

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

FGF = fibroblast growth factor

GA = Georgia

H&E = hematoxylin and eosin

HGF = hepatocyte growth factor

HPA = hypothalamic-pituitary-adrenal

IL-12 = interleukin 12

IL-6 = interleukin-6

Inc. = Incorporation

LASSO = least absolute shrinkage and selection operator

Ltd. = limited

MA = Massachusetts

MAPK = mitogen-activated protein kinase

MDMD 2 = murine double minute 2

MMP-2 = matrix metalloproteinase 2

MMP-9 = matrix metalloproteinase 9

MMPs = matrix metalloproteinases

MO = Missouri

mRNA = messenger ribonucleic acid

NC = North Carolina

NIH = National Institutes of Health

NK = natural killer

No = number

OSCC = oral squamous cell carcinoma

PBS = phosphate-buffered saline

PKA = protein kinase A

RNA = ribonucleic acid

RNase = ribonuclease

RQ = relative quantity

RT = room temperature

RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction

SNS = sympathetic nervous system

SP = São Paulo

St. = Saint

Stat 3 = signal transducer and activator of transcription 3

Statistical Analysis System = SAS

TGF- $\alpha$  = transforming growth factor alpha

TGF- $\beta$  = transforming growth factor beta

Th1 = type 1 helper cells

TrkB = tyrosine receptor kinase B

Twist = twist-related protein 1

TX = Texas

UK = United Kingdom

UNESP = Univ Estadual Paulista

USA = United States of America

UV = ultraviolet

VEGF = vascular endothelial growth factor

Wnt-1 = proto-oncogene protein Wnt-1



# **SUMÁRIO**

1. Introdução .....	32
2. Material e Método .....	37
3. Resultados .....	50
4. Discussão .....	63
Referências .....	74
Anexo A .....	83
Anexo B .....	85

# **INTRODUÇÃO**

## **Introduction\***

Studies have shown that hormones resulting from chronic stress may influence cancer progression (1-4). The two main pathways that have been investigated for mediating the emotional stress effects on cancer are the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (5) and sympathetic nervous system (SNS) (6). HPA axis activation occurs when neurons localized in the paraventricular nucleus secrete corticotropin-releasing factor (CRF); then, CRF stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which induces the adrenal glands to synthesize cortisol (2,5). In parallel, SNS activation during chronic stress can induce a dysregulated production of catecholamines norepinephrine and epinephrine by the central nervous system (CNS) and adrenal gland (2,6).

Stress hormones act on tumor cells deregulating the production of cytokines, chemokines and growth factors, which are related with cancer progression (1-4). Studies have shown that norepinephrine and epinephrine enhance the expression of genes involved in tumor angiogenesis and proliferation such as vascular endothelial growth factor (VEGF) (7,8) and interleukin-6 (IL-6) (9-11), as well as deregulate the production of matrix metalloproteinases (MMPs) (12-14) types 2 and 9; proteins that increase tumor invasion and metastasis occurrence. Catecholamines derived from SNS hyperactivity suppress the cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cell

---

\*Normalização segundo o periódico “Carcinogenesis” (Anexo B)

responses (15), and activate the expression of genes by oncogenic virus (16). Pre-clinical studies have demonstrated that stress-related hormones can affect ovarian (7,8,10,12,13), breast (17), lung (18) and colon (19) cancer progression. Clinical investigations have showed that patients with advanced-stage ovarian (9), colorectal (20), and head and neck (21) cancer have significant increased cortisol levels compared to patients with early-stage disease or healthy controls. However, there are no clinical evidences that stress-related hormones levels can influence cancer occurrence. Few pre-clinical investigations have demonstrated that stress-related hormones also may act on the regular cells promoting cancer development (22,23). Long exposures in dose response experiments with norepinephrine and epinephrine induced significant increases in the tumorigenicity of mouse fibroblasts (22). Chronic stress promoted tumor development (lymphomas and sarcomas) in C57BL6/J male mice by the attenuation of p53 protein levels and transcriptional activity, which were mediated by increased levels of corticosterone in the serum (23).

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin distributed mainly in the CNS, where it act as trophic factor for dopaminergic and cholinergic neurons. Evidences have shown that BDNF expression in the CNS can be modulated by stress (24). BDNF and its receptor TrkB have an important role as autocrine modulators being expressed in several organs (24). Acute and chronic stress may increase plasma BDNF levels in pre-clinical models (25,26). Studies have demonstrated that BDNF expression is involved with tumor cell proliferation and invasion process (27,28). BDNF has been identified in head and neck (27),

liver (28), prostate (29) and bladder (30) cancers, suggesting a role of neurotrophins in cancer development and progression.

Tumor microenvironment is an aberrant tissue environment composed by tumor epithelial cells and specialized mesenchymal cells (inflammatory cells, myoepithelial and endothelial cells, myofibroblasts and fibroblasts) surrounding by an altered extracellular matrix (ECM), which plays an important role in cancer development and progression (31,32). Interactions between the mesenchymal and epithelium cells through the morphogenic factors (eg. Wnt-1, HGF and TGF- $\beta$ ) and growth factors (eg. FGF, EGF and TGF- $\alpha$ ) secretion are altered in carcinomas and can influence the carcinogenesis (32). Although evidences show that stress and its neurohormones may influence cancer progression, there are no studies that have assessed the stress-related hormones levels in the tissue microenvironment before cancer and their influence on carcinogenesis and tumor progression. Chemical carcinogens exposure may affect important cellular metabolic functions as the production and release of different biological mediators (33,34). However, it is unclear how chemical carcinogens could act modulating stress hormones concentrations in the tumor microenvironment under carcinogenesis induction.

In the present study, we have used a pre-clinical oral carcinogenesis model to test the hypothesis that stress-related hormones concentrations in the tissue microenvironment before tumor induction could influence the cancer occurrence, clinicopathological variables and tumor progression-related genes expression. Furthermore, the local concentrations of these mediators were compared pre- and post-carcinogenesis induction and hormones levels in cancer

microenvironment were analyzed for association to tumor progression-related variables.