

**DANIEL GALERA BERNABÉ**

**EVIDÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE  
HORMÔNIOS DO ESTRESSE E CÂNCER DE  
BOCA**

**Araçatuba -SP**

**2009**

**DANIEL GALERA BERNABÉ**

**EVIDÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE  
HORMÔNIOS DO ESTRESSE E CÂNCER DE BOCA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Estomatologia.

**Orientador: Prof. Adjunto Éder Ricardo Biasoli**

**Co-Orientadora: Profa. Adjunta Sandra Helena Penha de Oliveira**

**Araçatuba -SP**

**2009**

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B517e

Bernabé, Daniel Galera

Evidências da associação entre hormônios do estresse e câncer de boca / Daniel Galera Bernabé. - Araçatuba : [s.n.], 2009  
98 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Prof. Éder Ricardo Biasoli

Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Neoplasias bucais 2. Neoplasias 3. Estresse 4. Hormônios  
5. Hidrocortisona 6. Norepinefrina

Black D64  
CDD 617.632

## Dados Curriculares

**Nascimento:** 30 de setembro de 1979 – Birigui / SP

**Filiação:** Pedro Felício Estrada Bernabé  
Marilene Galera Bernabé

**1998/2001** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

**2002/2003** Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**2004/2005** Mestrado em Odontologia, área de Estomatologia, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

**2006/2009** Doutorado em Odontologia, área de Estomatologia, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

## Dedicatória

Dedico essa grande oportunidade de aprendizado...

À **Vida...** em todas as suas formas de manifestação...

Aos **pacientes** deste estudo que por meio da doença, também manifestam a vida e encontram, como eu, oportunidades de crescimento muitas vezes pouco compreendidas. Cada vez mais vejo neles espelhos que refletem o estado em que me encontro. A todos eles o meu respeito.

Aos meus pais, **Pedro e Marilene**, pelo carinho em todos os momentos e, às vezes, por mim pouco compreendido. Sem a sustentação de vocês não poderia ter iniciado a construção de um ideal. A educação oferecida por vocês ofereceu base segura. Agora depende de mim.

Aos meus irmãos, **Thiago e Caio**, pela convivência e oportunidade de aprendizado. Que nossos laços de união se fortifiquem a cada dia.

Aos meus avós, **Maria e Pedro**, e **Alba e Hélio**, pelo grande carinho com que sempre me presentearam. Obrigado de coração.

A **todos amigos**, visíveis ou não aos olhos, que contribuíram para esta oportunidade. Continuemos.

# Agradecimentos

Agradeço com gratidão...

A **todos voluntários** que contribuíram para que este estudo fosse realizado.

Ao meu orientador, Prof. **Éder Ricardo Biasoli**, pela confiança em todo este percurso e estímulos para o aprendizado da oncologia. Agradeço pela acessibilidade quando necessário e pelas instruções seguras e sérias. Após este período, marca-me uma característica que o senhor desenvolveu e que hoje tento aprender, que é a liberdade e o respeito às expressões e às idéias. Agradeço pelo senhor ter acreditado e me apoiado no estudo de um assunto difícil e ainda polêmico. Em nenhum momento impôs limitações à idéia central da pesquisa e sua execução e esta é uma característica que considero fundamental a um pesquisador: não impor barreiras às tentativas de experimentar o novo, porque é através da liberdade de pensar e experimentar que descaracterizamos crenças velhas para crer em novos entendimentos sobre a vida. Muito obrigado. Continuemos.

À minha co-orientadora, Professora **Sandra Helena Penha de Oliveira**, amiga que tem me estimulado constantemente a lidar com minhas próprias limitações. A senhora é exemplo de coragem, dedicação, seriedade e, acima de tudo, honestidade. Hoje em dia é difícil encontrarmos seres como a senhora que pensam, sentem e agem com mais sinceridade. Este movimento, às vezes, é pouco compreendido porque infelizmente ainda vivemos buscando, ilusoriamente, relacionamentos revestidos de bondade, mas que escondem superficialidade e hipocrisia. Agradeço pela senhora ter aberto as portas do laboratório para que eu pudesse explorar as facetas das manifestações da vida de modo mais profundo e entrar em contato com minhas dificuldades. Considero que estou começando a engatinhar no aprendizado científico e esta conquista devo muito à senhora. Muito obrigado. Continuemos

## Agradecimentos

---

Ao amigo **Adriano**, parceiro de aprendizado científico e acima de tudo de aprendizado moral. Este tempo de convivência possibilitou que eu me conhecesse um pouco mais. Obrigado pelo auxílio constante nos experimentos e nos estímulos frente às dificuldades. Continuemos.

À amiga **Juliana**, que com carinho sempre esteve disposta ao auxílio nas coletas de sangue, agendamento e recrutamento dos voluntários da pesquisa. Obrigado por sua atenção e pelo exemplo de sensibilidade que nos estimula a sermos melhores. Continuemos.

Ao professor **Ricardo Della Coleta**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), por gentilmente ceder as linhagens celulares utilizadas nesta pesquisa e orientações sempre seguras quando necessitei. Sua atenção e esforço em ajudar são exemplos que tento incorporar.

À professora **Maria Lúcia Marçal Mazza Sundfeld** pelo auxílio na análise estatística deste trabalho e pela atenção prestada sempre que foi preciso.

Ao professor **Glauco** pelos vários estímulos durante este percurso.

Aos companheiros do laboratório de Farmacologia **Elisa, Isabelle, Leonardo, Márcio, Luciana, Rafaela, Renato, Sabrina, Samuel e Vanessa** pela amizade e ajuda constante na manutenção do laboratório e nos experimentos deste estudo. Que o laboratório e os sentimentos possa continuar.

Ao amigo **Bruno** pela amizade e contribuição com o agendamento e cirurgias dos pacientes.

Aos estagiários, **Rodrigo, Cleide, Renato, Leonardo e Camila**, pela disposição em auxiliar o agendamento de pacientes e coleta das peças cirúrgicas para a pesquisa.

## Agradecimentos

---

Aos professores **Glauco e Norberto** por estarem sempre dispostos a contribuir com a coleta de material para a pesquisa.

Aos médicos do COB, Dr. **Sebastião Conrado Neto** e Dr. **Francisco Collado** por ajudarem no recrutamento de pacientes e coleta de amostras e compartilhar o aprendizado da oncologia.

À Dra **Lisete Pinto Arjonas**, do laboratório de análises clínicas Sabin, pelo auxílio na avaliação da presença de sangue nas amostras de saliva.

Aos amigos do curso de pós-graduação, **Rafael, Adriana e Tereza**, pela salutar convivência durante esse período. Peço que Deus continue amparando vocês. Obrigado pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos professores, **Glauco Issamu Miyahara, Norberto Perri Moraes e Alvimar Lima de Castro** por todo aprendizado e atenção desde o curso de graduação. Obrigado pelos inúmeros estímulos que têm contribuído para minha melhoria moral e profissional.

Ao colega **Lúcio** pela ajuda na coleta e transporte das peças cirúrgicas.

À professora **Rita Cássia Menegati Dornelles** pelo valioso auxílio e orientação durante o período inicial de trabalho.

Ao **Centro de Oncologia Bucal (COB)**, em nome da supervisora Professora **Maria Lúcia Marçal Mazza Sundfeld** e ao **Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas** em nome da Professora **Sandra Helena Penha de Oliveira**.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP em nome do chefe do departamento **João César Bedran de Castro** pela convivência e aprendizado e oportunidade de pesquisa.



## Agradecimentos

---

Às funcionárias do Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA-UNESP, **Jane, Nair e Suzy**, pela agradável convivência. Vocês são exemplos de carinho e bom atendimento para aqueles que se encontram em intensos conflitos perante uma doença.

Aos orientadores: do doutorado, **Prof. Éder e Profa Sandra**; do mestrado, **Prof. Norberto e Prof. Marcelo**; da residência, **Prof. André Caroli**; e da iniciação científica, **Profa. Ana Maria**. Vocês contribuíram ativamente para meu crescimento e guardo no coração as virtudes de cada um. Espero um dia aproveitá-las e me tornar uma pessoa melhor. O que foi construído até aqui é parcela de vocês também. Agradeço de coração.

Ao amigo e grande colaborador Dr. **André Caroli** pela amizade e confiança. Obrigado pelo constante incentivo e por apresentar conhecimentos e intenções que tem como objetivo final o conforto emocional do enfermo. Continuemos.

Aos amigos, **Marlete, Lucas e Carlos** pela grande amizade e ensinamentos de vida. Continuemos.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, **José Marcelo Tamarin, José Carlos de Mendonça Neto, Luzia Maria de Oliveira Francischini, Maria Aparecida Martins da Silva, Marli Barbosa dos Santos, Mariana Bento Barbosa e Miriam Regina Mouro Ferraz Lima**.

Aos funcionários da Biblioteca da FOA-UNESP, **Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Izamar da Silva Freitas, Cláudio Hideo Matsumoto, Isabel Pereira de Matos, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Claudio Maciel Júnior e Luis Claudio Sedlacek** pela fantástica atenção, eficiência e carinho dispensados no atendimento de todos que os procuram. Parabéns.

## Agradecimentos

---

Aos amigos da secção de pós-graduação, **Valéria, Marina e Diogo**, pela dedicação exemplar ao trabalho que realizam e pelos laços de amizade e respeito construídos durante o curso de pós-graduação. Desculpe os constantes incômodos.

Aos Professores do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, **Ana Cláudia Okamoto, Elerson Gaetti Jardim Júnior, Marcelo Macedo Crivelini, Renata Callestini Filipini, Leda Maria Pescinini Salzedas e Antônio Augusto Ferreira Carvalho** pelos ensinamentos durante o curso de graduação.

Ao curso de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa de seu coordenador Professor **Idelmo Rangel Garcia Júnior**, pela oportunidade de aprendizado.

À Professora **Maria Tereza** pelos ensinamentos em minha vida escolar e auxílio na revisão do texto deste trabalho.

À **Angelina** por todos estes anos de cuidado.

Ao amigo **Daivid** pela amizade e grande contribuição com a parte gráfica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** pelo apoio durante estes dois anos e pelos recursos que viabilizaram, quase que integralmente, a realização desta pesquisa

## Epígrafe

***“É muito importante combater as moléstias do corpo, mas ninguém conseguirá eliminar efeitos, quando as causas permanecem. Usa os remédios humanos, todavia inclina-te para Jesus e renova-te, espiritualmente, nas lições de seu amor. A doença, quando não seja a advertência das células queixosas do tirânico senhor que as domina, é a mensageira amiga, convidando a meditações necessárias.”***

**Emmanuel**

***“Se os médicos são mal sucedidos, tratando da maior parte das moléstias, é que tratam do corpo, sem tratarem da alma. Ora, não se achando o todo em bom estado, impossível é que uma parte dele passe bem”***

**Allan Kardec**

Bernabé DG. Evidências da associação entre hormônios do estresse e câncer de boca [tese]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2009.

## Resumo

**Introdução:** Estudos têm mostrado que o estresse pode influenciar o desenvolvimento e a progressão do câncer. Entretanto, pouco se sabe sobre a interferência de fatores neurohormonais relacionados ao estresse, como o cortisol e a catecolamina norepinefrina (NE), sobre o carcinoma espinocelular (CEC) de boca.

**Proposição:** Neste estudo, nós investigamos se pacientes portadores de CEC de boca apresentam alterações nos níveis matinais de cortisol plasmático e salivar, da quimiocina CXCL12 plasmática e de óxido nítrico (NO) salivar. Além disso, investigamos os efeitos da NE, isoproterenol (um agonista  $\beta$ -adrenérgico) e cortisol sobre linhagens celulares derivadas de CEC de boca. **Pacientes e métodos:** Foram avaliados 34 pacientes com CEC de boca, 17 pacientes com CEC de orofaringe, 17 portadores de leucoplasia bucal, 27 indivíduos expostos ao tabagismo e/ou alcoolismo e 25 voluntários saudáveis. Os níveis salivares e plasmáticos de cortisol e os níveis plasmáticos de CXCL12 foram analisados por ELISA. A dosagem de NO salivar foi feita pelo método de Griess. A associação com variáveis clínicas como idade, sexo, consumo de cigarro e álcool, estágio clínico e ciência do diagnóstico foi investigada. Os efeitos da NE, do isoproterenol e do cortisol sobre a expressão de Interleucina-6 (IL-6) e NO foram investigados nas células derivadas de CEC de boca SCC9 e SCC25. A expressão de IL-6 pelas linhagens celulares foi analisada por PCR em tempo real e a produção da proteína no sobrenadante celular por ELISA. A dosagem de NO no sobrenadante foi feita pelo método de Griess. Os efeitos dos hormônios do estresse sobre a proliferação celular das células SCC9 foram avaliados por MTT. A expressão de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foi analisada nas linhagens SCC9 e SCC25 e em amostras humanas de CEC de boca, leucoplasia e mucosa bucal normal por PCR em tempo real. **Resultados:** Os níveis sanguíneos e salivares de cortisol foram significativamente mais altos nos pacientes portadores de câncer de boca em comparação com os portadores de leucoplasia, fumantes e/ou etilistas e voluntários saudáveis. Pacientes com CEC de orofaringe apresentaram níveis mais elevados de cortisol salivar em comparação aos fumantes e/ou etilistas e portadores de leucoplasia. Pacientes com CEC de boca com doença avançada (EC III e IV), apresentaram níveis de cortisol significativamente

## Resumo

---

mais elevados, em relação aos pacientes com tumor em estágio inicial (I e II). Homens com CEC de boca apresentaram níveis de cortisol salivar mais elevados do que as mulheres. Não houve diferenças em relação à idade, consumo de tabaco e álcool e ao fato de o paciente ter ou não ciência sobre o diagnóstico definitivo de câncer. Os níveis plasmáticos de CXCL12 foram maiores nos pacientes com CEC de boca e orofaringe em relação aos voluntários sem câncer, mas não houve significância estatística. Os níveis de NO salivar tenderam a ser mais baixos nos indivíduos fumantes e/ou etilistas em relação aos voluntários saudáveis e mais altos nos portadores de CEC bucal em estágio inicial em comparação aos pacientes com doença avançada. Não houve diferença nas concentrações de NO salivar entre pacientes com câncer e voluntários saudáveis. Análise por PCR por tempo real indicou expressão de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  nas linhagens SCC9 e SCC25. NE e isoproterenol aumentaram significativamente a produção de IL-6 nas duas linhagens de CEC bucal. Esses efeitos foram dependentes dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos já que a indução foi inibida por propranolol. O cortisol regulou a expressão de IL-6 nas células SCC9 dependendo da dose usada. Concentrações farmacológicas de cortisol (1000 nM) inibiram a produção de IL-6, enquanto dose que simula as condições de estresse (10 nM) tendeu a aumentar a produção após uma hora. Estímulos adrenérgicos em concentrações fisiológicas não afetaram a produção de NO. Cortisol a 10 nM aumentou significativamente a produção do metabólito pelas células SCC9, sendo este efeito bloqueado pelo inibidor de glicocorticoide mifepristone. NE a 10  $\mu$ M após 1 hora e cortisol a 1000 nM após 48 horas induziram proliferação das células SCC9. Todas amostras de CEC de boca expressaram receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Quantitativamente, a expressão do receptor  $\beta_1$  foi mais marcante nas amostras de CEC de boca em comparação à leucoplasia e mucosa normal. De modo geral, a expressão do receptor  $\beta_2$  foi menor no tecido leucoplásico em comparação ao tecido tumoral e à mucosa normal.

**Conclusão:** Esses resultados indicam a presença de uma desregulação na secreção de cortisol em pacientes com CEC de boca e trazem evidências de que os hormônios relacionados ao estresse psicológico podem influenciar a progressão do tumor.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Neoplasias. Estresse. Hidrocortisona. Norepinefrina. Hormônios

## Abstract

---

Bernabé DG. Evidence of an association between stress hormones and oral cancer [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2009.

### Abstract

**Background:** Investigations had showed that stress can influence the development and progression of cancer. However little is known about the interference of stress-related neurohormones factors on the oral squamous cell carcinoma (OSCC).

**Purpose:** In this study we investigated whether patients with OSCC show changes in levels of morning salivary and serum cortisol, serum CXCL12 and salivary nitric oxide (NO). Moreover we evaluated the effects of stress hormones on cell lines derived from OSCC.

**Patients and methods:** The serum levels of cortisol and CXCL12 and the levels of salivary cortisol and NO (form of NO<sub>2</sub>) were studied in thirty-four patients with OSCC, and compared with seventeen patients with oropharynx SCC, seventeen patients with oral leukoplakia, twenty-seven individuals exposed to cigarette smoke and / or alcohol and twenty-five healthy volunteers. The association with clinical data such as age, sex, consumption of cigarettes and alcohol, clinical stage and the consciousness of diagnosis was investigated. The effects of stress-related mediators including norepinefrine (NE), isoproterenol and cortisol on the production of Interleukine-6 (IL-6) and nitric oxide were studied in the cells derived from OSCC SCC9 and SCC25. The IL-6 expression was evaluated by real time PCR and the protein concentration in supernatants using ELISA. The concentration of NO in culture supernatants was measured with Griess reagent. The effects of hormones on cell proliferation of SCC9 cells was evaluated by MTT. The expression of  $\beta$ -adrenergic receptors was evaluated by real time PCR in SCC9 and SCC25 cells and in 20 samples of OSCC, 17 of leukoplakia and 15 of normal oral mucosa samples.

**Results:** The serum and salivary levels of cortisol were significantly higher in patients with OSCC compared with patients with leukoplakia, smokers and / or drinkers and healthy volunteers. Patients with oropharynx SCC had slightly lower levels of serum and salivary cortisol than patients with OSCC, and higher levels of salivary cortisol compared to smokers and / or drinkers and people with leukoplakia. Patients with OSCC with advanced disease (CS III and IV), showed levels of cortisol significantly higher than those with initial clinical stage (I and II). The salivary levels of cortisol were higher in men than women. There were no differences regarding age, tobacco and alcohol and the fact the patient has or has not consciousness about the definitive

diagnosis of cancer. The serum levels of CXCL12 were higher in patients with oral and oropharynx SCC compared with volunteers without cancer, but no statistical significance. The salivary levels of NO tended to be lower in smokers and/or drinkers without cancer than healthy controls. There were no differences in the NO concentrations between patients with cancer and healthy controls. Real time PCR studies with cell culture revealed constitutive expression of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 adrenergic receptors on SCC9 e SCC25 lines. NE and isoproterenol significantly enhanced IL-6 production by two OSCC lines. These effects were blocked by the  $\beta$  antagonist propranolol, supporting a role for  $\beta$ -adrenergic receptors in these effects. Effects of cortisol on IL-6 expression varied according to the cell line and dose. Pharmacological concentrations of cortisol (1000 nM) inhibited IL-6 production, while dose that simulates the stress conditions (10 nM) tended to enhanced expression after one hour. Inhibitory effect of IL-6 production in supernatant on SCC25 was found with cortisol at 1000 nM. Adrenergic stimulates do not affect NO production by SCC9 e SCC25. Cortisol (10 nM) significantly enhanced NO production by SCC9 cells. This effect was blocked by glucocorticoid inhibitor Mefipristone. NE (10 nM) after one hour and cortisol (1000 nM) after 48 h stimulate increase cell proliferation of SCC9 cells and these effects were interrupted by antagonists propranolol and mefipristone, respectively. All OSCC samples exhibited expression of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 adrenergic receptors and gene expression profile was different for each receptor in relation leukoplakia and normal oral mucosa samples. Quantitatively  $\beta$ -1 receptor was more marked in OSCC samples than leukoplakia and normal mucosa while  $\beta$ -2 receptor expression was slightly lower in leukoplakia. **Conclusion:** These results indicate the presence of a deregulation of the cortisol secretion in patients with OSCC and provide experimental evidences that stress hormones can affect OSCC progression.

Keywords: Mouth neoplasms. Neoplasms. Stress. Hydrocortisone. Norepinephrine. Hormones.

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1

- |            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Características clínicas dos indivíduos pertencentes aos grupos I (saudáveis), II (tabagistas e/ou etilistas), III (portadores de leucoplasia bucal), IV (portadores de CEC de orofaringe) e V (portadores de CEC de boca). | 33 |
| Tabela 2 - | Concentrações plasmáticas de cortisol e CXCL12 e salivares de cortisol e NO dos pacientes com CEC de boca, em relação ao sexo e estágio clínico.  | 42 |
| Tabela 3 - | Presença de hemoglobina livre em amostras salivares de pacientes com ou sem CEC de boca e em relação ao tamanho do tumor. Análise ajustada para valor aproximado de hemácias/ $\mu$ l na saliva.                            | 43 |



## Lista de Figuras

### Capítulo 1

- Figura 1 - Concentrações de cortisol no plasma **(A)** e na saliva **(B)** de voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal, e pacientes portadores de CEC de boca e orofaringe, foram mensuradas por ELISA. Resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (teste ANOVA). \* $p < 0,05$ : (grupo de CEC de boca comparado aos grupos de saudáveis, de risco e ao de leucoplasia para cortisol plasmático; grupo de CEC de orofaringe comparado ao de risco para cortisol salivar); \* $p < 0,01$ : (grupo de CEC de boca comparado aos grupos de saudáveis, de risco e de leucoplasia para cortisol salivar; grupo de CEC de orofaringe comparado ao grupo de leucoplasia para cortisol salivar). 38
- Figura 2 - Concentrações plasmáticas de CXCL12 de voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal, e pacientes portadores de CEC de boca e orofaringe, foram mensuradas por ELISA. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (Teste ANOVA) e valores de  $p < 0,05^*$  foram considerados significativos. 39
- Figura 3 - Concentrações salivares de nitrito em voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal e pacientes portadores de CEC de boca e orofaringe, foram mensuradas pelo método de Griess. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (Teste ANOVA) e valores de  $p < 0,05^*$  foram considerados significativos. 40

### Capítulo 2

- Figura 1 - Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M de Norepinefrina. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido de correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . 72

## Lista de Figuras

---

- Figura 2 - Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M de Norepinefrina. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 74
- Figura 3 - Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M de Isoproterenol. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 75
- Figura 4 - Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M de Isoproterenol. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 76
- Figura 5 - Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 e SCC25 após 1 hora de estímulo com 10  $\mu$ M de norepinefrina e com tratamento com 1  $\mu$ M de propranolol (Ne 10 + P) 30 minutos antes do estímulo com 10  $\mu$ M de norepinefrina em comparação às células não tratadas (Ne 0). Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 77

## Lista de Figuras

---

- Figura 6 - Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de cortisol. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 79
- Figura 7 - Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de cortisol. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) cujo valor foi = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 80
- Figura 8 - Quantidade de NO na forma de nitrito (NO<sub>2</sub>) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100 µM de Norepinefrina. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espetofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito (µM) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 82
- Figura 9 - Quantidade de NO na forma de nitrito (NO<sub>2</sub>) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100 µM de isoproterenol. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espetofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito (µM) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. 83

## Lista de Figuras

---

- Figura 10 - Quantidade de NO na forma de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de cortisol. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espectofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi  $<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . 84
- Figura 11 - Proliferação das células SCC9 após 6 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  de norepinefrina e após 6 horas (D), 24 horas (E) e 48 horas (F). Dados são apresentados em porcentagem de aumento ou diminuição da viabilidade celular em relação ao controle (células não tratadas). Todas as barras representam três experimentos realizados com 6 replicatas. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o P foi  $<0,05$ . 85
- Figura 12 - Expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  pelas linhagens celulares SCC9 e SCC25. Expressão de RNAm para os receptores foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  da linhagem SCC25 diferiu comparada com a SCC9 (média da quantidade relativa fixada no valor = 1). Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. 86
- Figura 13 - Expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  em amostras de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para os receptores foi analisada por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a média da quantidade relativa de expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  nas amostras de leucoplasia e de CEC de boca diferiram das amostras de mucosa bucal normal. 87
- Figura 14 - Perfil da expressão de RNAm para o receptor adrenérgico  $\beta_1$  em cada uma das amostras estudadas. Cada número representa um paciente dos grupos de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para o receptor  $\beta_1$  foi analisada por PCR em tempo real. 88
- Figura 15 - Perfil da expressão de RNAm para o receptor adrenérgico  $\beta_2$  em cada uma das amostras estudadas. Cada número representa um paciente dos grupos de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para o receptor  $\beta_2$  foi analisada por PCR em tempo real. 88

## Lista de Abreviaturas

<b>°C =</b>	Graus Celsius
<b>µl =</b>	Microlitro
<b>µM =</b>	Micromolar
<b>ACTH =</b>	Hormônio Adrenocorticotrófico
<b>BSA =</b>	Soro albumina bovino
<b>cDNA =</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementar
<b>CEC =</b>	Carcinoma Espinocelular
<b>CO<sub>2</sub> =</b>	Dióxido de Carbono
<b>COB =</b>	Centro de Oncologia Bucal
<b>COX-2 =</b>	Ciclooxygenase-2
<b>DMEM =</b>	Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco's
<b>DNA =</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>E =</b>	Epinefrina
<b>ELISA =</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ERK =</b>	Sinais extracelulares regulados por proteína Kinase
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> =</b>	Ácido Sulfúrico
<b>HPA =</b>	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
<b>IL =</b>	Interleucina
<b>KDa =</b>	Kilodalton
<b>ml =</b>	Mililitro
<b>MTT =</b>	Composto [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolium]
<b>N =</b>	Quantidade em mols de soluto
<b>NE =</b>	Norepinefrina
<b>NK =</b>	Células Natural Killer
<b>nm =</b>	Nanômetro
<b>nM ou nmol =</b>	Nanomolar

## Lista de Abreviaturas

---

<b>NO =</b>	Óxido Nítrico
<b>NO<sub>2</sub> =</b>	Nitrito
<b>NOS =</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>NS =</b>	Não significativa
<b>OMS =</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS =</b>	Tampão salina-fosfato
<b>PCR =</b>	Reação da Cadeia de Polimerase
<b>Pg =</b>	Picograma
<b>RNA =</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub> =</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>RNAses =</b>	Enzimas que degradam o RNA
<b>rpm =</b>	Rotações por minuto
<b>RQ =</b>	Quantidade Relativa
<b>RT-PCR</b>	Reação da Cadeia de Polimerase por transcriptase reversa
<b>SFB =</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SNS =</b>	Sistema Nervoso Simpático
<b>UNESP =</b>	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
<b>Valor de <i>p</i> =</b>	Valor de probabilidade
<b>VEGF =</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

# Sumário

1	Preâmbulo	23
2	<b>Capítulo 1 - Aumento dos níveis de cortisol sanguíneo e salivar em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e associação com o sexo e estágio clínico</b>	25
2.1	Resumo	25
2.2	Abstract	27
2.3	Introdução	29
2.4	Pacientes e Métodos	31
2.5	Resultados	37
2.6	Discussão	44
2.7	Referências	52
3	<b>Capítulo 2 - Hormônios do estresse aumentam a proliferação celular, estimulam a secreção de interleucina-6 e regulam a produção de óxido nítrico em células de carcinoma espinocelular de boca</b>	58
3.1	Resumo	58
3.2	Abstract	60
3.3	Introdução	62
3.4	Materiais e Métodos	65
3.5	Resultados	71
3.6	Discussão	89
3.7	Referências	95
	Anexos	100

Esta tese foi elaborada em “Formato de Artigo” conforme as Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP.



## 1 Preâmbulo

Há muito tempo se fala nas relações entre as emoções e o corpo biológico. Desde épocas remotas, relatos já aventavam uma possível relação entre o estado psicológico do doente e sua doença física. Apesar de a humanidade ter percorrido vários séculos de experiências, pouca progressão houve no entendimento da relação entre a mente e o corpo. Até pensamos e pronunciamos afirmações de suspeita de que essas interações realmente existem, mas, na prática diária das ciências da saúde, esse entendimento pouco é aplicado. Uma das causas disso é a carência de um corpo maior de estudos científicos que esclareça melhor essas relações.

Muitas vezes nos perguntamos: “Será que o que eu penso ou sinto pode interferir na saúde física?”, “Como as emoções negativas podem contribuir para o desequilíbrio fisiológico?”. Algumas pesquisas têm tentado trazer luz às indagações acima descritas. Fatores psicológicos e comportamentais têm sido associados à manifestação de diversas doenças tais como: infecções, doenças do aparelho gastrointestinal, desordens auto-imunes, doenças cardiovasculares e, dentre outras, o câncer. Embora evidências recentes mostrem que alterações neuroendócrinas e imunológicas podem interagir bidirecionalmente com fatores emocionais e modular a resposta do paciente antes e após o diagnóstico de câncer, os mecanismos de tais interações ainda são pouco conhecidos. Apesar de estarmos evoluindo em alguns entendimentos, vemos que ainda encaramos doenças como o câncer de modo fragmentado, dando muito mais valor ao tumor e nos esquecendo de investigar as possíveis causas inerentes ao seu portador. Essa fragmentação do estudo dificulta o delineamento de pesquisas que investiguem mais a fundo certas questões que ainda permanecem sem respostas, como por exemplo, como várias pessoas que fumam e bebem não desencadeiam o câncer, embora esses sejam fatores de risco consagrados para a doença?

Foi com o objetivo de tentar compreender um pouco mais sobre o contexto integralizado do indivíduo e sua doença física que desenvolvemos o projeto deste estudo. Começar a entender como ocorrem as relações entre fatores neuroendócrinos associados ao estresse psicológico e o tumor foi, neste momento, nosso objetivo. Para isso, estudamos em pacientes portadores de carcinoma de

## Preâmbulo

---

boca e cultura de células neoplásicas o comportamento de substâncias relacionadas ao estado de estresse emocional. Queríamos saber como o principal hormônio relacionado ao estresse se apresentava, do ponto de vista sistêmico, no portador de carcinoma de boca. Dentro de um modelo laboratorial de estudo, também pesquisamos quais poderiam ser alguns dos efeitos locais de produtos liberados pelos dois principais eixos biológicos reativos ao estresse emocional. O paciente com câncer, seu sangue, sua saliva, o tecido tumoral e o cultivo de células cancerígenas em laboratório, foram as ferramentas utilizadas para iniciar uma linha de pesquisa cujo principal propósito será conhecer de modo mais profundo as manifestações da vida. Os resultados desse esforço, ainda que pequeno, encontram-se nos dois estudos que compõem este trabalho.

## **2 Capítulo 1 – Aumento dos níveis de cortisol sanguíneo e salivar em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e associação com o sexo e estágio clínico\***

### **2.1 Resumo**

**Introdução:** Numerosas interações existem entre os sistemas nervoso, endócrino e imune. Uma desregulação dessas interações tem sido observada em pacientes com câncer e podem interferir no prognóstico. O carcinoma espinocelular (CEC) de boca é associado com fatores ambientais, principalmente o consumo de tabaco e álcool. A presença de desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em portadores de CEC de boca ainda não tem sido relatada.

**Propósito:** Neste estudo, nós investigamos se pacientes portadores de CEC de boca apresentam alterações nos níveis matinais de cortisol sanguíneo e salivar, de CXCL12 sanguíneo e de óxido nítrico (NO) salivar.

**Pacientes e métodos:** Os níveis sanguíneos de cortisol e CXCL12 e os níveis salivares de cortisol e NO foram analisados em 34 pacientes com CEC de boca e comparados com 17 pacientes com CEC de orofaringe, 17 portadores de leucoplasia bucal, 27 indivíduos tabagistas e/ou etilistas e 25 voluntários saudáveis. A associação com dados clínicos como idade, sexo, consumo de cigarro e álcool, estágio clínico e ciência do diagnóstico foi investigada.

**Resultados:** Os níveis sanguíneos e salivares de cortisol foram significativamente mais altos nos pacientes portadores de CEC de boca em comparação com os portadores de leucoplasia, fumantes e/ou etilistas e voluntários saudáveis. Pacientes com CEC de orofaringe apresentaram discreta diminuição dos níveis de cortisol sanguíneo e salivar em relação aos portadores de CEC de boca, e níveis mais elevados de cortisol salivar em comparação aos fumantes e/ou etilistas e portadores de leucoplasia. Pacientes com CEC de boca com doença avançada (EC III e IV), apresentaram níveis de cortisol significativamente

---

\* Texto formatado de acordo com as normas de publicação do periódico Head & Neck (Anexo C)

## Capítulo 1

---

mais elevados, em relação aos pacientes com tumor em estágio inicial (I e II). Homens com CEC de boca apresentaram níveis de cortisol salivar mais elevados do que as mulheres. Não houve diferenças nos níveis de cortisol em relação à idade, consumo de tabaco e álcool e ao fato de o paciente ter ou não ciência sobre o diagnóstico definitivo de câncer. Os níveis plasmáticos de CXCL12 foram maiores nos pacientes com CEC de boca e orofaringe em relação aos voluntários sem câncer, mas não houve significância estatística. Os níveis de NO salivar tenderam a ser mais baixos nos indivíduos fumantes e/ou etilistas em relação aos voluntários saudáveis. Não houve diferença nas concentrações de NO entre pacientes com câncer e voluntários saudáveis.

**Conclusão:** Esses resultados indicam a presença de uma desregulação na secreção de cortisol nos pacientes com CEC de boca e orofaringe.

Palavras-chave: câncer de boca; câncer; cortisol; eixo HPA; estresse.

## 2.2 Abstract

**Background:** There are numerous interactions between the nervous systems, endocrine and immune. Deregulation of these interactions have been observed in patients with cancer and may interfere with the prognosis. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is associated with environmental factors, especially the consumption of tobacco and alcohol. The presence of disrupting the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) in patients with OSCC has not been reported.

**Purpose:** In this study we investigated whether patients with OSCC show changes in levels of morning salivary and serum cortisol, serum CXCL12 and salivary nitric oxide (NO).

**Patients and methods:** The serum levels of cortisol and CXCL12 and the levels of salivary cortisol and NO (form of NO<sub>2</sub>) were studied in thirty-four patients with OSCC, and compared with seventeen patients with oropharynx SCC, seventeen patients with oral leukoplakia, twenty-seven individuals exposed to cigarette smoke and / or alcohol and twenty-five healthy volunteers. The association with clinical data such as age, sex, consumption of cigarettes and alcohol, clinical stage and the consciousness of diagnosis was investigated.

**Results:** The serum and salivary levels of cortisol were significantly higher in patients with OSCC compared with patients with leukoplakia, smokers and / or drinkers and healthy volunteers. Patients with oropharynx SCC had slightly lower levels of serum and salivary cortisol than patients with OSCC, and higher levels of salivary cortisol compared to smokers and / or drinkers and people with leukoplakia. Patients with OSCC with advanced disease (CS III and IV), showed levels of cortisol significantly higher than those with initial clinical stage (I and II). The salivary levels of cortisol were higher in men than women. There were no differences regarding age, tobacco and alcohol and the fact the patient has or has not consciousness about the definitive diagnosis of cancer. The serum levels of CXCL12 were higher in patients with oral and oropharynx SCC compared with volunteers without cancer, but no statistical significance. The salivary levels de NO<sub>2</sub> tended to be lower in smokers and/or drinkers without cancer than healthy controls. There were no differences in the NO<sub>2</sub> concentrations between patients with cancer and healthy controls.

## Capítulo 1

---

**Conclusion:** These results indicate the presence of a deregulation of the cortisol secretion in patients with OSCC.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma; cancer; cortisol; HPA axis; stress; hormones.

## 2.3 Introdução

É crescente o número de estudos que mostram que influências na progressão do câncer não ocorrem somente por eventos locais relacionados ao tumor, mas também por fatores psiconeuroimunológicos inerentes ao paciente.<sup>1,2,3</sup> Além da reconhecida interferência do sistema imune, pesquisas revelam que desregulações neurohormonais podem interferir no comportamento de determinados tipos de tumores.<sup>4,5</sup>

Um dos hormônios mais importantes para a regulação fisiológica do organismo é o cortisol, glicocorticóide produzido pelo córtex das glândulas supra-renais em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado pela hipófise após ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo. A secreção de cortisol ocorre em resposta ao estresse físico e psicológico e seu nível sanguíneo é modulado pelo ritmo circadiano e por mecanismos de inibição por *feed-back*.<sup>1,3</sup> Investigações têm mostrado a presença de alterações emocionais e uma desregulação na secreção de cortisol em portadores de câncer.<sup>5-7</sup> Elevados níveis de cortisol têm sido associados em alguns tipos de tumores ao estágio clínico avançado, podendo determinar imunossupressão e facilitar a progressão do tumor.<sup>8,9</sup> Considerável aumento dos níveis de cortisol sanguíneo também tem sido associado a um pobre prognóstico e menor resposta ao tratamento em pacientes com câncer de mama,<sup>10,11</sup> ovário,<sup>12</sup> rim,<sup>13</sup> pulmão<sup>14</sup> e câncer colorretal.<sup>15</sup>

As quimiocinas compõem uma larga família de proteínas de baixo peso molecular (7-15 kDa) que recentemente têm emergido como participantes ativas na carcinogênese e metástases.<sup>16</sup> A quimiocina CXCL12 ou fator-1 derivado de células estromais (SDF-1) e seu receptor (CXCR4) são expressos por mais de 23 tipos de cânceres e apresentam importante papel nos mecanismos de proliferação, angiogênese e metástase.<sup>16,17</sup> Nos últimos anos, estudos têm mostrado a participação do sistema CXCL12/CXCR4 na progressão do Carcinoma Espinocelular (CEC) de boca. Células de CEC bucal expressam CXCR4 e têm sua capacidade de invasão e disseminação estimulada por CXCL12.<sup>18,19</sup> Evidências apontam também que no CEC bucal a CXCL12, por meio de mecanismos parácrinos e autócrinos, poderia exercer papel fundamental para a ocorrência de metástases linfonodais e à distância.<sup>20</sup> Além disso, o sistema CXCL12/CXCR4 pode ser modulado por

## Capítulo 1

---

glicocorticoides em uma das inúmeras vias de interação entre o sistema endócrino e imune.<sup>21</sup> Níveis sistêmicos aumentados de CXCL12 têm sido observados em portadores de alguns tipos de câncer, mas ainda não foram avaliados em pacientes com CEC de boca.

O óxido nítrico (NO) é um produto do estresse que tem importante papel em muitos processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo, neurotransmissão, vasodilatação, inflamação e imunidade.<sup>22</sup> É gerado como um produto reacional da conversão enzimática de arginina-L para citrulina-L por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): endotelial (NOSe), neuronal (NOSn) e induzida (NOSi).<sup>22</sup> Têm crescido o número de estudos que mostram a participação do NO na gênese de vários tipos de câncer. Acredita-se que além da promoção de angiogênese tumoral, o sistema NOS/NO possa influenciar a síntese de DNA e RNA e a proliferação das células cancerígenas.<sup>22,23</sup> Entretanto, evidências recentes também mostram que o NO pode apresentar um papel *dual* no câncer, exibindo características pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, dependendo da concentração e tipo celular.<sup>22</sup> Aumento dos níveis plasmáticos e salivares de NO tem sido encontrado em portadores de CEC de boca<sup>24,25</sup> e outros tipos de câncer.<sup>26-28</sup>

Apesar da existência de estudos que mostraram a presença de alterações dos níveis sanguíneos de cortisol em pacientes com câncer, esta desregulação hormonal e sua relação com os níveis de CXCL12 e NO em portadores de tumores de boca e orofaringe ainda não foi investigada. Deste modo, o propósito deste estudo foi avaliar os níveis de secreção matinal de cortisol plasmático e salivar, CXCL12 plasmático e NO salivar em pacientes portadores de CEC de boca e orofaringe e compará-los aos de portadores de leucoplasia bucal, indivíduos tabagistas e/ou etilistas e voluntários saudáveis.



## 2.4 Pacientes e Métodos

### Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e incluiu no total 120 pacientes e voluntários (88 homens e 32 mulheres, com média geral de idade de 60,25 anos). Todos os participantes foram recrutados no período entre novembro de 2006 e maio de 2009 e foram distribuídos em 5 grupos. O grupo I foi composto por 25 voluntários saudáveis sem história de câncer ou exposição ao tabagismo e etilismo e o grupo II, por 27 voluntários sem história de câncer, mas expostos a pelo menos um dos dois principais fatores de risco para o Carcinoma Espinocelular (CEC) de boca e orofaringe (fumo e álcool). O grupo III foi formado por 17 pacientes portadores de leucoplasia de mucosa bucal diagnosticada de acordo com o critério da OMS.<sup>29</sup> O grupo IV foi composto por 17 pacientes portadores de CEC de orofaringe e o grupo V, por 34 pacientes portadores de carcinoma espinocelular (CEC) de boca. Os pacientes dos grupos IV e V foram recrutados consecutivamente após serem matriculados no Centro de Oncologia Bucal (COB) da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP). Os critérios de inclusão para esses dois grupos foram: tumor primário ser localizado nos 2/3 anterior da língua, assoalho, gengiva, rebordo, palato duro, região jugal e retromolar para o grupo V; e palato mole, úvula, amígdala e base de língua para o grupo IV; apresentar diagnóstico histopatológico de CEC e não ter sido submetido a nenhum tipo de tratamento. Todos os participantes não poderiam possuir doença ou estar sob medicação que interferisse no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).

As características clínicas dos indivíduos pertencentes aos 5 grupos estão descritas na tabela I. As variáveis clínicas avaliadas foram: idade, sexo, localização do tumor, intensidade de consumo de tabaco e álcool, estadiamento clínico da doença<sup>30</sup> e a presença ou ausência de dentes. O fato de o paciente ter ou não ciência do diagnóstico de câncer também foi analisado. As intensidades de consumo de tabaco e álcool foram avaliadas utilizando uma escala de escore de 1 a 4 pontos de acordo com a quantidade de consumo de cigarros ou doses de bebida alcoólica por dia.<sup>31</sup>

## Capítulo 1

---

Das nove mulheres portadoras de CEC de boca cinco apresentavam estágio clínico I e II e quatro estágio clínico III e IV. Com exceção de uma voluntária do grupo II e outra do grupo V, que se encontravam no período de pré-menopausa todas as outras mulheres do estudo estavam na pós-menopausa.

## Capítulo 1

**Tabela 1.** Características clínicas dos indivíduos pertencentes aos grupos I (saudáveis), II (tabagistas e/ou etilistas), III (portadores de leucoplasia bucal), IV (portadores de CEC de orofaringe) e V (portadores de CEC de boca).

Variáveis	Grupo I Saudáveis n=25	Grupo II Risco n=27	Grupo III Leucoplasia n=17	Grupo IV CEC Orofaringe n=17	Grupo V CEC Boca n=34	Valor de P
<b>Média Idade (anos)</b> (variação)	62,2 (±8,36) (47-79)	56,5 (±8,31) (45-75)	63,4 (±13,33) (38-82)	58,9 (±9,9) (47-83)	60,7 (±10) (43-80)	0,1353
<b>Sexo: n (%)</b>						0,6480
Masculino: n (%)	17 (68)	19 (70,4)	12 (70,6)	15 (88,2)	25 (73,5)	
Feminino: n (%)	8 (32)	8 (29,6)	5 (29,4)	2 (11,8)	9 (26,5)	
<b>Localização da lesão primária: n (%)</b>						
Assoalho	-	-	0 (0)	-	9 (26,5)	
Gengiva	-	-	1 (5,9)	-	0 (0)	
Língua	-	-	6 (35,3)	-	11(32,4)	
Mucosa jugal	-	-	4 (23,5)	-	1 (2,9)	
Palato	-	-	1 (5,9)	-	2 (5,9)	
Rebordo	-	-	3 (17,6)	-	5 (14,7)	
Retromolar	-	-	2 (11,8)	-	6 (17,6)	
<b>Tabagismo: n (%)</b>						0,5210
Abstêmio	25 (100)	3 (11,1)	2 (11,8)	1 (5,9)	4 (11,8)	
1		2 (7,4)	5 (29,4)	1 (5,9)	4 (11,8)	
2		13 (48,1)	7 (41,2)	6 (35,3)	12 (35,3)	
3		3 (11,1)	2 (11,7)	2 (11,7)	3 (8,7)	
4		6 (22,3)	1 (5,9)	7 (41,2)	11 (32,4)	
<b>Etilismo: n (%)</b>						0,0012*
Abstêmio	25 (100)	5 (18,5)	5 (29,4)	1 (5,9)	8 (23,5)	
1		6 (22,3)	3 (17,6)	1 (5,9)	5 (14,7)	
2		7 (25,9)	7 (41,2)	0 (0)	6 (17,6)	
3		5 (18,5)	2 (11,8)	2 (11,7)	3 (8,8)	
4		4 (14,8)	0 (0)	13 (76,5)	12 (35,4)	
<b>Estadiamento Clínico: n (%)</b>						0,4389
I	-	-	-	1 (5,9)	6 (17,6)	
II	-	-	-	2 (11,8)	7 (20,6)	
III	-	-	-	4 (23,5)	8 (23,5)	
IV	-	-	-	10 (58,8)	13 (38,3)	
<b>Presença de dentes: n (%)</b>						0,1311
Sim	20 (80)	15 (55,6)	8 (47,1)	8 (47,1)	22 (64,7)	
Não	5 (20)	12 (44,4)	9 (52,9)	9 (52,9)	12 (25,5)	
<b>Ciência do diagnóstico de câncer: n (%)</b>						0,5306
Sim	-	-	-	7 (41,2)	10 (29,4)	
Não	-	-	-	10 (58,8)	24 (70,6)	

Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher

\* Valores considerados estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

Tabagismo: cada ponto equivale 10 cigarros industrializados de papel/dia, 2 cigarros manufaturados de palha/dia, 2 charutos ou cachimbos/dia. Etilismo: cada ponto equivale a uma dose de bebida alcoólica destilada/dia, uma garrafa de cerveja/dia ou uma taça de vinho/dia.

## **Coleta de saliva e sangue periférico**

Amostras de saliva e sangue foram coletadas de todos os pacientes e voluntários entre as 8:00 e 10:00 horas da manhã, sempre no mesmo ambiente preparado para diminuir interferências externas. A saliva não estimulada foi coletada com tubo estéril. O paciente cuspiu no tubo até o volume de 10 ml ou até se atingir um período máximo de 20 minutos de coleta. Em seguida, a amostra era mantida no gelo, levada para o laboratório e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante era coletado e estocado a -80°C até a realização das dosagens. O sangue foi coletado por punção venosa, por meio de seringa descartável de 20 ml heparinizada. Posteriormente, a amostra de sangue era centrifugada a 2.500 rpm, sob refrigeração a 4°C, durante 15 minutos. O plasma era separado e devidamente acondicionado a -80°C para dosagens posteriores.

## **Dosagens de Cortisol no plasma e na saliva**

As concentrações plasmáticas e salivares de cortisol foram mensuradas com kits específicos, por ensaio imunoenzimático (ACTIVE<sup>®</sup>, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

## **Dosagem de CXCL12 plasmática**

Os níveis de CXCL12 no plasma foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 16-18 horas a 4°C, com anticorpo anti-CXCL12 (Anti-human CXCL12 Antibody, R&D Systems) diluído em tampão de fosfato de cálcio. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS 1% , contendo 0,5% de Tween 20 e incubadas durante 2 horas, em temperatura ambiente, com PBS 1% contendo soroalbumina bovina 1% (BSA). As placas, então, foram lavadas e incubadas com 50 µl de plasma dos indivíduos pertencentes aos 5 grupos e com CXCL12 recombinante (para a curva padrão), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotilado

## Capítulo 1

---

(Biotinylated Anti-human-CXCL12 Antibody, R&D Systems), por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com solução de estreptoavidina (Sigma<sup>®</sup>) com PBS 1%, contendo soroalbumina bovina 1% (BSA), por aproximadamente 30 minutos, à temperatura ambiente. Após nova lavagem, o substrato tetrametilbenzidina (Invitrogen<sup>®</sup>) foi adicionado conforme instruções do fabricante. Após 30 minutos, solução de paralisação da reação (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) foi adicionada, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

### **Determinação de NO salivar**

A análise da presença de nitrito (NO<sub>2</sub>) total como indicador das concentrações de NO na saliva foi realizada pelo método de Griess.<sup>32</sup> Em placas de 96 poços, 50 µl das amostras de saliva foram incubadas com igual volume do reagente de Griess por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o índice de densidade óptica foi analisado por espectrofotometria (540 nm). Os resultados foram expressos em µM de NO<sub>2</sub> comparados com uma curva padrão realizada com nitrito de sódio em concentrações de 200 a 0,78 µM.

### **Determinação da presença de sangue nas amostras salivares**

Para avaliar se havia contaminação por sangue na saliva de portadores de CEC bucal, amostras de saliva de 8 pacientes com CEC de boca cujos tumores fossem maiores do que 4 cm foram comparadas com as de 8 pacientes com tumores medindo de 0 a 4 cm (T1 e T2) e de 8 voluntários tabagistas e/ou etilistas sem CEC. As amostras de saliva foram submetidas a um teste comumente usado para analisar a presença de hemoglobina livre na urina (URISCAN<sup>®</sup>, YD Diagnostics), de acordo com orientações do fabricante.

**Análise estatística**

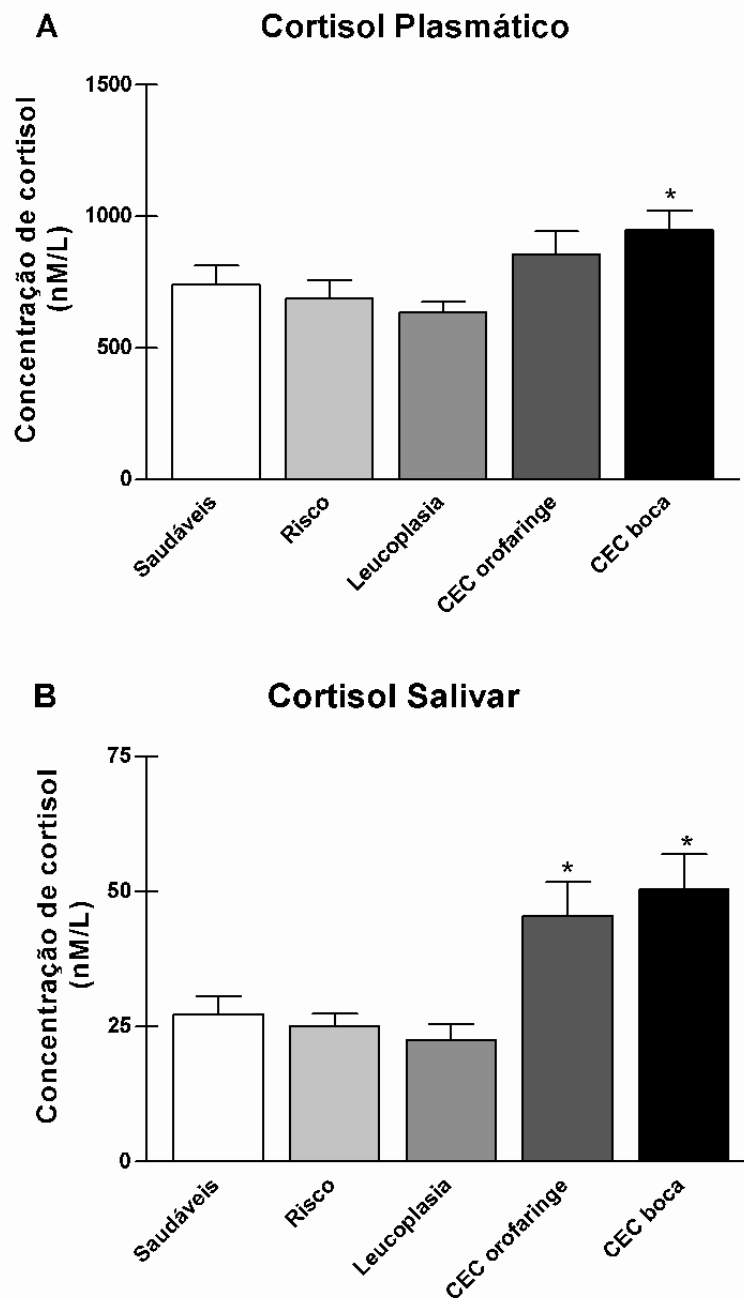
A análise das variáveis qualitativas do grupo de pacientes e voluntários foi realizada pelo teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher por meio do programa Epi-info 2000 versão 3.5.1. Os dados referentes às concentrações plasmáticas e salivares foram transformados em log para ajuste da normalidade dos resíduos. Para avaliar as diferenças entre os grupos, foram utilizados teste de Tukey e análise de variância (ANOVA). Teste de Pearson foi utilizado para avaliar se os níveis de CXCL12 e NO eram correlacionados com os níveis de cortisol. Para avaliação da interferência das variáveis clínicas, foi realizada a análise de variância multivariada com a decomposição das interações, através do teste t, utilizando o programa SAS, versão 9.1. Os resultados foram apresentados nos gráficos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 2.5 Resultados

Os grupos não apresentaram diferença estatística em relação à idade, sexo, fumo e presença ou ausência de dentes. As variáveis estadiamento clínico e ciência do diagnóstico de câncer também não diferiram estatisticamente entre os grupos IV e V. Em relação ao consumo de bebida alcoólica os portadores de leucoplasia bebiam menos e os pacientes com CEC de orofaringe consumiam maior quantidade (Tabela 1).

### Cortisol plasmático e salivar

A média das concentrações plasmáticas de cortisol em pacientes com CEC de boca foi de 947,7 nmol/L (EPM  $\pm$ 76,35 nmol/L), significativamente mais alta do que a média das concentrações plasmáticas dos voluntários saudáveis (média de 741,8 nmol/L,  $\pm$ 72,66), dos indivíduos do grupo de risco (687,7 nmol/L,  $\pm$ 72,16) e dos portadores de leucoplasia bucal (635,1 nmol/L,  $\pm$ 40,07) (Figura 1A). Os níveis de cortisol plasmático dos pacientes com CEC de orofaringe foram discretamente menores que a dos portadores de CEC de boca e mais altos do que a dos integrantes dos grupos I, II e III, mas sem diferenças estatísticas significantes (Figura 1A). Os indivíduos tabagistas e/ou etilistas tenderam a apresentar concentrações de cortisol discretamente mais baixas em comparação aos voluntários saudáveis (Figuras 1A e 1B). As alterações dos níveis de cortisol salivar entre os grupos acompanharam a dos níveis de cortisol plasmático. A média das concentrações salivares de cortisol do grupo de portadores de CEC de boca (50,38 nmol/L,  $\pm$ 6,5) foi cerca do dobro da média dos grupos I, II e III ( $p < 0,01$ ) (Figura 1B). Os portadores de CEC de orofaringe apresentaram níveis de cortisol salivar significativamente mais elevados do que os tabagistas e/ou etilistas ( $p < 0,05$ ) e portadores de leucoplasia ( $p < 0,01$ ) (Figura 1B).

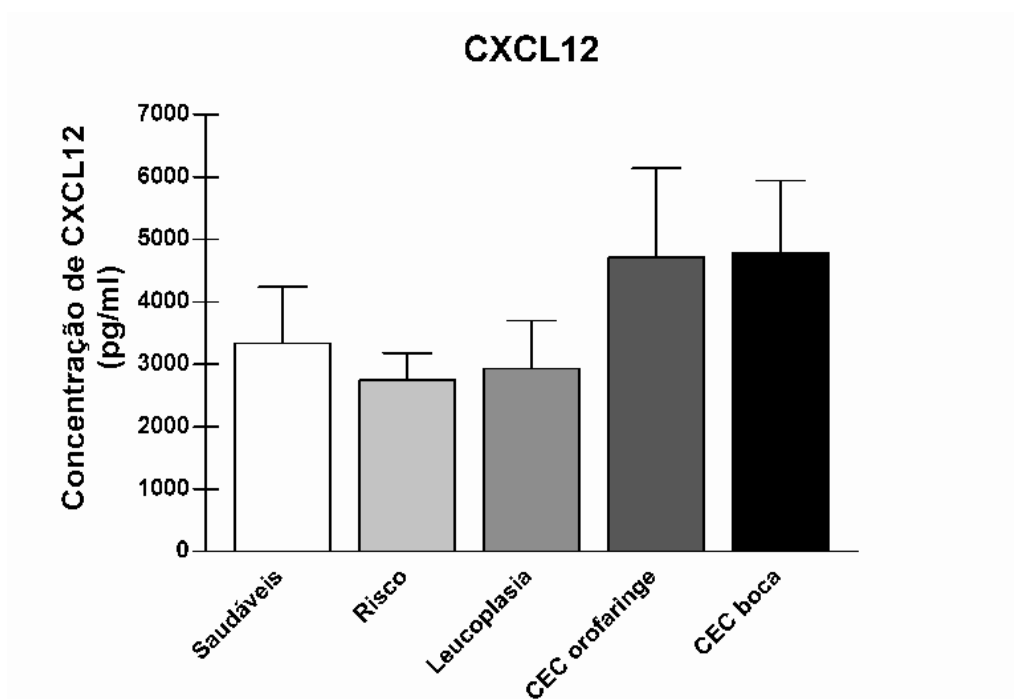


**Figura 1.** Concentrações de cortisol no plasma (A) e na saliva (B) de voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal e pacientes portadores de CEC de orofaringe e boca foram mensuradas por ELISA. Resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (teste ANOVA). \* $p < 0,05$ : (grupo de CEC de boca comparado aos grupos de saudáveis, de risco e ao de leucoplasia para cortisol plasmático; grupo de CEC de orofaringe comparado ao de risco para cortisol salivar); \* $p < 0,01$ : (grupo de CEC de boca comparado aos grupos de saudáveis, de risco e de leucoplasia para cortisol salivar; grupo de CEC de orofaringe comparado ao grupo de leucoplasia para cortisol salivar).



## CXCL12 plasmática

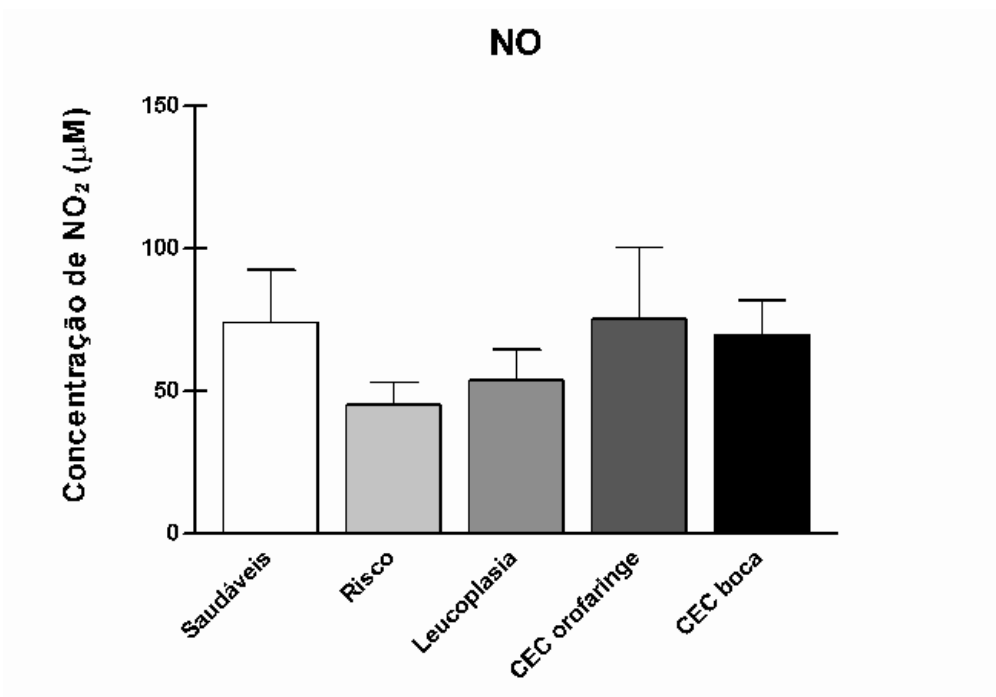
Apesar de as concentrações plasmáticas de CXCL12 dos pacientes com CEC de boca (4767 pg/ml,  $\pm 1173$ ) e dos pacientes com CEC de orofaringe (4704 pg/ml,  $\pm 1437$ ) terem sido maiores que as dos outros grupos, as diferenças não foram significativas (Figura 2). No grupo de portadores de CEC também não foi encontrada correlação entre as concentrações de CXCL12 e as concentrações de cortisol plasmático ( $p=0,9427$ ).



**Figura 2.** Concentrações plasmáticas de CXCL12 de voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal, e pacientes portadores de CEC de orofaringe e boca foram mensuradas por ELISA. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (Teste ANOVA) e valores de  $p < 0,05^*$  foram considerados significativos.

## NO salivar

Também não foram encontradas entre os grupos, diferenças significativas nos níveis salivares de NO. Entretanto, as concentrações salivares de NO dos indivíduos tabagistas e/ou etilistas sem câncer (45,21  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\pm 7,95$ ) e a de portadores de leucoplasia (53,82  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\pm 10,82$ ) tenderam a ser mais baixas do que as dos controles saudáveis (74,19  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\pm 18,38$ ), pacientes com CEC bucal (69,87  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\pm 11,95$ ) e pacientes com CEC de orofaringe (75,26  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\pm 24,94$ ) (Figura 3). Não foi possível encontrar correlação entre os níveis de NO e os níveis de cortisol salivar ( $p=0,6731$ ).



**Figura 3.** Concentrações salivares de NO (na forma de nitrito – NO<sub>2</sub>) em voluntários saudáveis, voluntários expostos aos fatores de risco fumo e/ou álcool, portadores de leucoplasia bucal e pacientes portadores de CEC de orofaringe e boca foram mensuradas pelo método de Griess. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (Teste ANOVA) e valores de  $p < 0,05^*$  foram considerados significativos.

## **Relação entre os níveis plasmáticos e salivares de cortisol, CXCL12 e NO e as variáveis clínicas**

Os níveis de cortisol plasmático e salivar dos pacientes portadores de CEC de boca foram relacionados significativamente ao estágio clínico da doença (Tabela 2). Pacientes em estágio avançado da doença (estádios clínicos III e IV) apresentaram níveis mais elevados de cortisol plasmático e salivar, quando comparados aos pacientes com a doença em estágio inicial (estádios clínicos I e II) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). O mesmo foi observado em pacientes com CEC de orofaringe, mas, devido ao pequeno número de pacientes ( $n=3$ ) com estádios clínicos III e IV, a análise estatística não foi realizada. Por outro lado, pacientes com CEC de boca em estágios avançados apresentaram concentrações mais baixas de NO salivar ( $49,29 \mu\text{M}$ ,  $\pm 11,38$ ), em relação aos pacientes com a doença em estágios iniciais ( $103,5 \mu\text{M}$ ,  $\pm 23,95$ ), mas este achado foi marginalmente significativo. Níveis elevados de cortisol salivar foram observados em pacientes do sexo masculino com CEC de boca ( $57,81 \text{ nmol/L}$ ,  $\pm 7,80$ ) em comparação aos do sexo feminino ( $27,02 \text{ nmol/L}$ ,  $\pm 5,28$ ) (Tabela 2). Alterações significativas das concentrações de cortisol plasmático, CXCL12 e NO, em relação ao sexo, não foram observadas nos pacientes com câncer (Tabela 2). As variáveis: idade, tabagismo, etilismo e presença ou ausência de dentes, não apresentaram correlação significativa com nenhuma das substâncias analisadas. O fato de o paciente ter conhecimento sobre o diagnóstico do câncer no momento da coleta do sangue e da saliva não determinou alteração relevante no nível de cortisol em comparação aos pacientes que ainda não sabiam do diagnóstico.

## Capítulo 1

**Tabela 2.** Concentrações plasmáticas de cortisol e CXCL12 e salivares de cortisol e NO dos pacientes com CEC de boca, em relação ao sexo e estadiamento clínico.

Variáveis	Cortisol plasma (nmol/L)	Cortisol saliva (nmol/L)	CXCL12 plasma (pg/ml)	NO saliva ( $\mu$ mol/L)
	Média $\pm$ EPM (Variação)	Média $\pm$ EPM (Variação)	Média $\pm$ EPM (Variação)	Média $\pm$ EPM (Variação)
<b>Sexo</b>				
Masculino	960,5 ( $\pm$ 104,3) <sup>a</sup> (370,6 – 2460)	57,8 ( $\pm$ 7,80) <sup>c</sup> (15,2 - 175,2)	5178 ( $\pm$ 1574) <sup>e</sup> (365 – 40519)	59,2 ( $\pm$ 10,7) <sup>f</sup> (0,74 – 173)
Feminino	883,8 ( $\pm$ 111,5) <sup>a</sup> (421,1-1289)	27,0 ( $\pm$ 5,28) <sup>d</sup> (12,1 - 50,4)	3627 ( $\pm$ 765,9) <sup>e</sup> (1756 – 9410)	102 ( $\pm$ 37,67) <sup>f</sup> (15 - 237)
<b>Estádio Clínico</b>				
I/II	724,2 ( $\pm$ 83,68) <sup>a</sup> (370,6 – 1135)	30,28 ( $\pm$ 5,96) <sup>c</sup> (12,1 - 73,47)	3149 ( $\pm$ 640) <sup>e</sup> (365 – 9410)	103,5 ( $\pm$ 23,9) <sup>f</sup> (15 - 237)
III/IV	1056 ( $\pm$ 107,7) <sup>b</sup> (464,5 – 2460)	54,61 ( $\pm$ 6,05) <sup>d</sup> (15,2 - 95,91)	5769 ( $\pm$ 1843) <sup>e</sup> (1166 – 40519)	49,29 ( $\pm$ 11,4) <sup>f</sup> (0,74 – 182)

Teste de Tukey; mesmas letras indicam não haver diferença entre as categorias. Letras diferentes indicam haver diferença estatística com  $p < 0,05$

NO = Óxido nítrico; CEC = Carcinoma espinocelular; EPM = erro padrão da média

### Presença de sangue nas amostras salivares de portadores de CEC bucal

A análise da presença de hemoglobina livre nas amostras de saliva mostrou que 5 (62,5 %) das 8 amostras dos pacientes portadores de CEC de boca com tumor até 4 cm apresentavam contaminação por sangue. Nos pacientes com tumores extensos (maiores que 4 cm), todas as amostras salivares apresentaram contaminação por sangue. Por outro lado, 6 (75%) amostras salivares de voluntários tabagistas e/ou etilistas sem lesão bucal foram negativas para a contaminação de sangue (Tabela 3).

## Capítulo 1

---

**Tabela 3.** Presença de hemoglobina livre em amostras salivares de pacientes com ou sem CEC de boca e em relação ao tamanho do tumor. Análise ajustada para valor aproximado de hemácias/ $\mu$ l de saliva.

<b>Pacientes</b>	<b>Número aproximado de hemácia/<math>\mu</math>l saliva</b>			
	<b>0</b>	<b>Até 10</b>	<b>&gt;10 a 50</b>	<b>&gt; 50</b>
<b>Com tumor até 4 cm</b>	1	2	2	3
<b>Com tumor maior que 4 cm</b>	0	-	5	3
<b>Sem tumor</b>	6	1	0	1

Teste exato de Fisher. Detectada diferença estatística entre amostras salivares de pacientes com tumores maiores que 4 cm e amostras de voluntários sem tumor ( $p=0,0006$ ).

## 2.6 Discussão

A principal revelação deste estudo foi a de que pacientes com CEC de boca apresentaram níveis matinais significativamente mais elevados de cortisol plasmático e salivar do que voluntários sem câncer, expostos ou não ao tabagismo e/ou etilismo e portadores de leucoplasia bucal. Esse resultado foi influenciado diretamente pelo aumento dos níveis de cortisol em pacientes com o estágio avançado da doença (EC III e IV) e indicam uma desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) nos portadores de CEC de boca associada à progressão da doença. Alterações neuroendócrinas, como o aumento dos níveis de cortisol sistêmico em relação a controles saudáveis, também têm sido observadas em pacientes com câncer de outras localizações.<sup>10-15</sup> Neste estudo, pacientes portadores de CEC de orofaringe tenderam a ter um aumento nos níveis de cortisol plasmático e salivar similar aos pacientes com CEC de boca, fortalecendo as evidências de que a presença de malignidade está associada a uma desregulação da secreção de cortisol.

As causas da hipercortisolemia associadas ao câncer ainda não tem sido totalmente esclarecidas. Estudos têm mostrado a presença de uma disfunção da glândula adrenal em portadores de câncer.<sup>33,34</sup> Jenkins et al.<sup>34</sup> detectaram que a presença de malignidade foi associada a um aumento difuso das glândulas adrenais, e a uma falha na supressão dos níveis de cortisol quando os pacientes eram tratados com glicocorticóide. Contudo, tanto o aumento das glândulas adrenais quanto os níveis elevados de cortisol nem sempre têm sido acompanhados de um aumento dos níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sugerindo a participação de outras vias estimulatórias.<sup>9,34</sup> Atualmente, uma das hipóteses mais aceitas é a de que citocinas, como a interleucina-1alfa (IL1-alfa), IL1-beta, IL-2 e IL-6, exerçam efeitos estimulatórios diretos sobre a secreção adrenocortical de cortisol e regulem vias neuroendócrinas.<sup>3,9,34</sup> O aumento conjunto, por exemplo, dos níveis de cortisol e IL-6 tem sido relatado em portadores de tumores metastáticos e pode indicar vias interativas de desregulação do eixo HPA.<sup>9</sup>

Acreditamos que o aumento dos níveis de cortisol nos pacientes com câncer de boca e orofaringe em comparação aos voluntários sem câncer observado neste estudo possa estar relacionado diretamente a dois fatores. O primeiro seria a

## Capítulo 1

---

presença de um alto nível de estresse psicológico nos pacientes com doença avançada devido à percepção de evolução da lesão sem melhora e sentimento de medo da morte. Embora 29,4% dos portadores de CEC de boca e 41,2% dos portadores de CEC de orofaringe deste estudo apresentarem ciência do diagnóstico no momento da coleta de sangue e saliva, isso não influenciou significativamente os níveis de cortisol matinal. Apesar de os sentimentos dos pacientes e de seus níveis de estresse psicológico no momento da coleta não terem sido avaliados neste estudo, outras investigações têm mostrado que pacientes com câncer de cabeça e pescoço podem apresentar altos níveis de angústia, ansiedade, tristeza e medo antes e após o tratamento.<sup>35,36</sup> Estes sentimentos parecem estar relacionados diretamente às crenças do paciente em relação à doença. A crença de que o câncer representa para o paciente um sinônimo de morte, foi evidenciada em um interessante estudo com pacientes com câncer de boca e orofaringe.<sup>37</sup> Possivelmente, os sentimentos resultantes desta crença podem se intensificar conforme a progressão da doença e promover considerável estresse psicológico. Esse, associado à fadiga física e privação de sono podem fortemente desequilibrar o eixo HPA. Um outro estudo<sup>38</sup> com portadores de câncer de cabeça e pescoço em fase de pré-tratamento mostrou que pacientes com a doença em estágio avançado apresentaram maior ocorrência de distresse psicológico, condição que engloba uma resposta negativa a experiências estressantes como desordens adaptativas e depressão. Esse dado pode ajudar a explicar o fato de termos encontrado em nosso estudo maior secreção de cortisol matinal em pacientes com CEC de boca em estágios avançados, reforçando a possibilidade de interação entre o estresse psicológico e ativação do eixo HPA. Os níveis similares de cortisol plasmático e salivar encontrados nos pacientes com CEC com estágio clínico I e II, portadores de leucoplasia e controles saudáveis, podem indicar que apenas o conhecimento da presença de lesão bucal e a procura por atendimento não foram capazes de provocar alteração significativa no eixo HPA a ponto de desregular a secreção de cortisol matinal. Entretanto, isto não descarta que outras vias neurohormonais, possam ser ativadas após o paciente notar a presença da lesão.

Um segundo evento que pode ter atuado conjuntamente com os fatores psicológicos na indução do quadro de hipercortisolemia dos pacientes com câncer deste estudo é o efeito estimulatório de citocinas sobre o sistema neuroendócrino. Sabe-se, por exemplo, que os níveis sistêmicos de IL-6 aumentam em situações de

## Capítulo 1

---

estresse psicológico.<sup>39</sup> Além disso, pacientes com CEC de cabeça e pescoço apresentam níveis elevados de IL-6 em comparação a controles saudáveis, e as próprias células do CEC podem produzir IL-6 de maneira autócrina.<sup>40,41</sup> Seja por indução direta das alterações emocionais no SNC e/ou em decorrência da liberação da citocina pelas células do tumor primário ou metastático, a grande quantidade de IL-6 circulante e seus efeitos em regiões hipotalâmicas parece ser uma importante via de desregulação do eixo HPA em pacientes com CEC de boca e orofaringe.

Uma diferença mais pronunciada nos níveis de cortisol entre os pacientes com CEC de boca e voluntários sem câncer foi encontrada nas amostras de saliva em relação às amostras de plasma. A hipótese mais plausível para explicar esse resultado seria a possível presença de sangue residual nas amostras de saliva dos pacientes com CEC de boca. Apesar de os pacientes, cujas amostras estavam claramente contaminadas por sangue, terem sido excluídos da pesquisa, a possibilidade de contaminação não poderia ser descartada. A quantificação de hemossiderina nas amostras salivares confirmou essa hipótese, sendo maior nos tumores de boca extensos, os quais tendem a apresentar maior sangramento. O sangue liberado da área tumoral pode se incorporar à saliva coletada e elevar os níveis de diversas substâncias que, na saliva, costumam ter uma concentração reduzida em comparação ao sangue. Investigação recente em pacientes sem câncer também mostrou que um aumento dos níveis salivares de citocinas pode estar relacionado à contaminação por sangue nas amostras de saliva.<sup>42</sup> A presença de sangue em duas das 8 amostras salivares de pacientes sem tumor, provavelmente foi devido à presença de doença gengival e/ou periodontal (periodontite) que também podem ser focos de sangramento bucal.

Sabidamente, os dois principais fatores de risco para o CEC de boca e orofaringe são o fumo e o consumo de álcool. Em nossa amostra, 88,2% dos pacientes com CEC de boca fumavam e 76,3% consumiam bebida alcoólica. Estudos têm mostrado que tanto o cigarro como o álcool são capazes de desregular a secreção de cortisol.<sup>43,44</sup> A nicotina é o principal componente do cigarro capaz de interferir no eixo HPA. O fumo de cigarros e aplicações intravenosas de nicotina ativam o eixo HPA em fumantes habituais, não fumantes e animais de laboratório.<sup>43</sup> Alto consumo de álcool tem sido associado a um aumento dos níveis de cortisol e a uma desregulação dos mecanismos de *feed-back* do eixo HPA.<sup>44</sup> No presente estudo, níveis matinais de cortisol foram avaliados em um grupo de risco para o CEC



## Capítulo 1

---

de boca, composto por tabagistas e/ou etilistas. A maioria dos participantes desse grupo (70,4%) bebiam e também fumavam. Nós não encontramos diferença nos níveis de cortisol plasmático e salivar nesse grupo em relação ao grupo controle. Alguns outros estudos também não foram capazes de detectar diferenças nos níveis de cortisol entre fumantes e não-fumantes.<sup>43,45</sup> A ativação do eixo HPA pela nicotina parece não depender tanto de suas altas concentrações, mas principalmente da frequência em que o cigarro é fumado durante o dia.<sup>43</sup> Em nosso estudo, não sabemos qual foi o intervalo entre a coleta de sangue e saliva e o fumo do último cigarro por parte dos voluntários, mas esse tempo pode ter sido suficiente para diminuição da concentração de nicotina e baixa reatividade do eixo HPA. Badrick et al.<sup>46</sup> também não encontraram, em uma grande amostra de voluntários, diferença nos níveis matinais de cortisol salivar entre etilistas e não etilistas. Porém, o consumo de álcool inibiu o ritmo circadiano de cortisol durante os outros períodos do dia.

Há algumas evidências de que distúrbios neuroedócrinos em portadores de câncer de cabeça e pescoço talvez não estejam relacionados somente ao eixo HPA como observado no presente estudo. Remenár et al.<sup>47</sup> observaram a presença de um significativo aumento nos níveis dos hormônios hipofisários folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço em relação a portadores de doença alcoólica e de voluntários saudáveis. Contudo, os resultados obtidos em nossa investigação, juntamente com as observações de Remenár et al.,<sup>47</sup> indicam que a presença de uma desregulação dos hormônios da glândula hipófise em portadores de tumores malignos de cabeça e pescoço é uma possibilidade e necessita de maior investigação.

No presente estudo, os níveis de cortisol salivar foram significativamente mais elevados nos pacientes com CEC bucal do sexo masculino do que os do sexo feminino. Porém, os níveis plasmáticos não diferiram de maneira significativa entre homens e mulheres. Esse dado é difícil de ser explicado, visto que elucidações sobre os mecanismos de interação entre os hormônios sexuais e o eixo HPA ainda são escassas. De todo modo, alguns pontos merecem ser discutidos. Primeiramente, as formas de cortisol avaliadas no plasma e na saliva são diferentes. Enquanto na saliva, o cortisol se apresenta nessa forma livre metabolicamente ativa, no plasma ele é encontrado em sua forma total com a maior parte ligado a proteínas, principalmente como corticosteroide ligado à globulina (CLG).<sup>48</sup> Kudielka et al.<sup>49</sup>

## Capítulo 1

---

observaram que mulheres idosas submetidas ao estresse apresentaram níveis globais mais elevados de cortisol plasmático do que os homens idosos. Porém, igualmente ao observado em nosso estudo com portadores de CEC de boca, os níveis de cortisol livre na saliva em resposta ao estresse foram significativamente mais altos nos homens em relação às mulheres.<sup>49</sup> Uma das hipóteses para a discrepância dos níveis de cortisol plasmático e salivar em relação ao sexo poderia ser a presença de maior quantidade de CLG e conseqüente menor concentração de cortisol livre nas mulheres em comparação aos homens com CEC de boca. No presente estudo, as concentrações plasmáticas de CLG não foram mensuradas, o que dificulta interpretações mais detalhadas sobre a relação de alterações nos níveis de CLG com os de cortisol livre entre homens e mulheres com a doença. Tanto as flutuações nas concentrações de CLG como as dos hormônios sexuais podem modular as respostas do eixo HPA,<sup>48,49</sup> mas suas participações na resposta neurohormonal dos pacientes com câncer são ainda pobremente entendidas. Outro fator que precisaria ser estudado é a presença ou não de diferenças nas reações emocionais entre homens e mulheres no enfrentamento da doença. A diferença encontrada neste estudo entre os sexos masculino e feminino nos níveis de cortisol livre salivar tem que ser interpretada com resguardo, visto o pequeno número de mulheres que compuseram a amostra analisada. De todo modo, compreender melhor esses achados e suas possíveis repercursões biológicas por meio de novas investigações é importante, visto que mais de 75% dos casos de CEC de boca ocorrem em homens.<sup>50</sup>

Duas moléculas têm sido relacionadas com a progressão do CEC de boca, a quimiocina CXCL12 ou fator-1 derivado de células estromais (SDF-1) e o óxido nítrico (NO), um produto do estresse oxidativo. As avaliações dos níveis circulantes de CXCL12 em portadores de câncer têm mostrado resultados discrepantes. Aumento das concentrações plasmáticas de CXCL12 em relação aos controles saudáveis e associação ao grau de estadiamento do tumor foram encontrados em portadores de câncer de mama<sup>51</sup> e estômago.<sup>52</sup> Por outro lado, Dimberg et al.<sup>53</sup> encontraram diminuição desses níveis em portadores de carcinoma colorretal. O presente estudo foi o primeiro a investigar alterações nos níveis circulantes de CXCL12 em portadores de CEC de boca. Embora os níveis de CXCL12 plasmático estivessem elevados nos pacientes com CEC em relação aos outros grupos, essa diferença não teve significância estatística. Isso, provavelmente, foi devido à alta

## Capítulo 1

---

variabilidade das concentrações de CXCL12, principalmente nos grupos dos pacientes com CEC de boca e orofaringe. Essa é uma das dificuldades de estudos clínicos que mensuram as concentrações sistêmicas de quimiocinas e citocinas em humanos<sup>1</sup>. A presença de uma alta variabilidade nesses estudos pode estar relacionada, por exemplo, aos diferentes estágios da doença estudada e às características individuais de resposta endócrina e imune de cada paciente.<sup>1,3</sup> Pesquisas têm mostrado que o sistema SDF-1 e o seu receptor CXCR4 podem participar da progressão do CEC de boca, em processos como invasão ou micrometástases no sítio primário e principalmente metástases linfonodais.<sup>18,20</sup> Os resultados preliminares que encontramos, indicando uma tendência no aumento dos níveis de CXCL12 em pacientes com CEC de boca com a doença em estágio avançado, pode ser mais um indício da importância dessa quimiocina como biomarcador para a evolução da doença, mas há necessidade de maior investigação.

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre os grupos nos níveis de NO, houve uma tendência do grupo de risco (tabagistas e/ou etilistas) apresentar nível mais baixo de NO em relação aos voluntários saudáveis e portadores de câncer. Esse resultado se assemelha aos achados de outros investigadores que mostraram uma redução nos níveis salivares de espécies nitrogenadas em fumantes em relação aos não fumantes.<sup>54,55</sup> Em nosso estudo não foram verificadas diferenças nas concentrações de NO salivar entre os portadores de câncer e o grupo controle saudável. Este resultado difere dos achados de Bahar et al.<sup>25</sup> que em um grupo de 25 portadores de CEC de boca identificaram aumento significativo dos níveis salivares NO em comparação a indivíduos sem a doença. Diferentemente desse estudo, nossos dados indicaram uma forte tendência dos portadores com a doença avançada apresentarem menores concentrações de NO salivar em relação aos pacientes com a doença em estágio inicial. Bahar et al. não informaram em seu estudo qual era o estadiamento clínico dos portadores de CEC que compuseram a amostra. Em outro estudo, Beevi et al.<sup>24</sup> não avaliaram os níveis salivares, mas observaram que 15 portadores de CEC de boca com estádios III e IV apresentaram altos níveis de NO no sangue em comparação aos controles saudáveis. Essa possível relação dos níveis de NO com o estágio clínico do paciente com CEC de boca precisará ser melhor investigada. Possibilidades como diferenças em alguns passos metodológicos e possível interferência na dosagem de

## Capítulo 1

---

NO pela contaminação por sangue observada em nossas amostras de pacientes com tumores extensos necessitam ser esclarecidas. Analisar as concentrações de NO no sangue dos pacientes da amostra do presente estudo pode auxiliar nesses esclarecimentos. Isso é importante visto que diferenças nas concentrações de NO podem produzir respostas totalmente opostas no CEC de boca. Lee et al.<sup>56</sup> em um estudo laboratorial, mostraram que altas concentrações de NO inibiram o crescimento de células de CEC de boca por estimularem apoptose, enquanto NO em baixas concentrações induziram diferenciação celular.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo mostrando alterações dos níveis circulantes de cortisol em pacientes com CEC de boca e orofaringe quando comparados com indivíduos saudáveis, tabagistas e/ou etilistas e portadores de uma lesão cancerizável de boca. Consequências da desregulação do eixo HPA para a evolução do câncer têm sido reveladas por diversas investigações prévias. Altos níveis de cortisol, por exemplo, foram associados a uma menor sobrevida em portadores de câncer colorretal<sup>57</sup> e câncer de mama.<sup>58</sup> O presente estudo não avaliou a relação entre os níveis de cortisol dos portadores de câncer e a sobrevida, devido ao pouco tempo de pós-tratamento dos pacientes. Alterações na secreção de cortisol podem influenciar, por múltiplas vias, a imunidade anti-tumoral do paciente.<sup>2-4</sup> Quase todas as células do sistema imune exibem receptores para o cortisol e outros produtos neuroendócrinos do eixo HPA, que podem causar alterações no tráfego celular, proliferação, secreção de citocinas, produção de anticorpos e atividade citolítica.<sup>8,59</sup> Desregulação da secreção de cortisol têm sido associada com redução do número de células *Natural Killer* (NK) e diminuição de sua citotoxicidade contra o tumor.<sup>1,6,58</sup> Além do comprometimento imunológico, o cortisol pode promover efeitos diretos sobre as células neoplásicas. Esses efeitos, até o momento, parecem ser mais evidentes em tumores considerados hormônio-dependentes. Em tumores de mama e ovário, por exemplo, o cortisol pode inibir a apoptose das células tumorais via ativação de receptores de glicocorticóide e interferir negativamente na resposta ao tratamento quimioterápico.<sup>60,61</sup> Além disso, cortisol e catecolaminas podem agir sinergicamente em linhagens celulares de carcinoma de pulmão, potencializando a proliferação das células neoplásicas.<sup>62</sup> Por outro lado, estímulos inibitórios dos glicocorticóides sobre o crescimento celular têm sido mostrados em linhagens de osteossarcoma<sup>63</sup> e câncer de próstata.<sup>64</sup> Poucos estudos têm procurado verificar os efeitos diretos do cortisol sobre o CEC de boca, e

## Capítulo 1

---

até o momento, significativas alterações moleculares não têm sido encontradas.<sup>65,66</sup> Os diferentes efeitos do cortisol sobre as células tumorais parecem depender do tipo celular, ativação do receptor, vias de sinalização induzidas e das concentrações do hormônio. Investigações adicionais são necessárias para esclarecer os efeitos biológicos das alterações da secreção de cortisol sobre as células do CEC de boca.

A avaliação da alteração neurohormonal sistêmica no presente estudo tem algumas limitações. As análises dos níveis de cortisol sistêmico e salivar foram realizadas em amostras coletadas em apenas um período do dia (manhã). Sabe-se que uma avaliação mais criteriosa do eixo HPA é feita identificando as flutuações da secreção de cortisol em mais de um período diário (análise do ritmo circadiano). Nossos resultados também não nos permitem afirmar se a alteração neurohormonal encontrada nos pacientes com câncer está apenas acompanhando a doença ou se apresenta consequências prognósticas. Entretanto, pelo nosso conhecimento, estas são as primeiras evidências de que pacientes portadores de CEC de boca apresentam alterações significativas na produção de cortisol. Estudos posteriores são necessários para desvendar o real papel da disfunção do eixo HPA, no desenvolvimento e/ou progressão do câncer de cabeça e pescoço.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a enfermeira Juliana Benevenuto Reis pelo auxílio na coleta das amostras de saliva e sangue e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2006/59835-0).

## 2.7 Referências

1. Reiche, EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:617–625.
2. Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle* 2007;6:430-433.
3. Miller AH, Ancoli-Israel S, Bower JE, Capuron L, Irwin MR. Neuroendocrine-immune mechanisms of behavioral comorbidities in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:971-982.
4. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2006;6:240-248.
5. Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun* 2009;23:10-15.
6. Sephton S, Spiegel D. Circadian disruption in cancer: a neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun* 2003;17:321-328.
7. Mormont MC, Lévi F. Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J Cancer* 1997;70:241-247.
8. Ben-Eliyahu S, Page GG, Schleifer SJ. Stress, NK cells, and cancer: still a promissory note. *Brain Behav Immun* 2007;21:881-887.
9. Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, et al. Immune and endocrine mechanisms of advanced cancer-related hypercortisolemia. *In Vivo* 2007;21:647-650.
10. Vedhara K, Tuinstra J, Miles JN, Sanderman R, Ranchor AV. Psychosocial factors associated with indices of cortisol production in women with breast cancer and controls. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:299-311.
11. Spiegel D, Giese-Davis J, Taylor CB, Kraemer H. Stress sensitivity in metastatic breast cancer: analysis of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:1231-1244.
12. Lutgendorf SK, Weinrib AZ, Penedo F, et al. Interleukin-6, cortisol, and depressive symptoms in ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 2008;26:4820-4827.

13. Rasmuson T, Ljungberg B, Grankvist K, Jacobsen J, Olsson T. Increased serum cortisol levels are associated with high tumour grade in patients with renal cell carcinoma. *Acta Oncol* 2001;40:83-87.
14. Mazzocchi G, Carughi S, De Cata A, et al. Neuroendocrine alterations in lung cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* 2003;24:77-82.
15. Rich T, Innominato PF, Boerner J, et al. Elevated serum cytokines correlated with altered behavior, serum cortisol rhythm, and dampened 24-hour rest-activity patterns in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1757-1764.
16. Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol* 2004;48:489-496.
17. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004;14:171-179.
18. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, et al., CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;214:231-241.
19. Tang CH, Chuang JY, Fong YC, Maa MC, Way TD, Hung CH. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappaB pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29:1483-1492.
20. Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, et al. Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 2007;5:685-694.
21. Kim YS, Bigliani LU, Fujisawa M, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, CXCL12) is increased in subacromial bursitis and downregulated by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory agents. *J Orthop Res* 2006;24:1756-1764.
22. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-721.
23. Sonveaux P, Jordan BF, Gallez B, Feron O. Nitric oxide delivery to cancer: why and how? *Eur J Cancer* 2009;45:1352-1369
24. Beevi SS, Rasheed AM, Geetha A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:379-385.

## Capítulo 1

---

25. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 2007;109:54-59.
26. Moriyama A, Masumoto A, Nanri H, et al. High plasma concentrations of nitrite/nitrate in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1520-1523.
27. Eroglu A, Demirci S, Ayyildiz A, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and nitrite as an estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;80:1630-1634.
28. Akbulut H, Altuntas F, Akbulut KG, et al. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine* 2002;20:184-190.
29. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46: 518-539.
30. Sobin LH, Witteking CH, editors. *TNM: classificação dos tumores malignos*. 6. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2004. 253 p.
31. Rapoport, A., Kowalski, L.P. O diagnóstico clínico em cabeça e pescoço. In: Brandão LC, Ferraz AR. *Cirurgia de cabeça e pescoço*. São Paulo: Roca; 1989. p.5-10.
32. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;274:177-188.
33. Vincent JM, Morrison ID, Armstrong P, Reznek RH. Computed tomography of diffuse, non-metastatic enlargement of the adrenal glands in patients with malignant disease. *Clin Radiol* 1994;49:456-460.
34. Jenkins PJ, Sohaib SA, Trainer PJ, Lister TA, Besser GM, Reznek R. Adrenal enlargement and failure of suppression of circulating cortisol by dexamethasone in patients with malignancy. *Br J Cancer* 1999;80:1815-1819.
35. Pandey M, Devi N, Thomas BC, Kumar SV, Krishnan R, Ramdas K. Distress overlaps with anxiety and depression in patients with head and neck cancer. *Psychooncology* 2007;16:582-586.



36. Vickery LE, Latchford G, Hewison J, Bellew M, Feber T. The impact of head and neck cancer and facial disfigurement on the quality of life of patients and their partners. *Head Neck*. 2003;25:289-296.
37. Kowalski ISG. As possibilidades da representação social para apoiar programas educacionais de prevenção do câncer [tese]. São Paulo: Pontifícia Universidade Católica de São Paulo; 2001.
38. Kugaya A, Akechi T, Okuyama T, et al. Prevalence, predictive factors, and screening for psychologic distress in patients with newly diagnosed head and neck cancer. *Câncer* 2000;88:2817-2823.
39. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9090-9095.
40. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 2008;113:750-757.
41. Okamoto M, Hiura K, Ohe G, et al. Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. *Cancer* 2000;89:1966-1975.
42. Suh KI, Kim YK, Kho HS. Salivary levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in patients with burning mouth syndrome. *Arch Oral Biol* 2009;54:797-802.
43. Rohleder N, Kirschbaum C. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *Int J Psychophysiol* 2006;59:236-243.
44. Ogilvie K, Lee S, Weiss B, Rivier C. Mechanisms mediating the influence of alcohol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune and nonimmune signals. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:243S-247S.
45. Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P 3rd. Influence of nicotine on cardiovascular and hormonal effects of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1984;36:74-81.
46. Badrick E, Bobak M, Britton A, Kirschbaum C, Marmot M, Kumari M. The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:750-757.
47. Remenár E, Számel I, Budai B, et al. Increase of hypophyseal hormone levels in male head and neck cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2007;13:341-344.
48. Kajantie E, Phillips DI. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:151-178.

49. Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:83-98.
50. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26:31-38.
51. Potter SM, Dwyer RM, Curran CE, et al. Systemic chemokine levels in breast cancer patients and their relationship with circulating menstrual hormones. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:279-287.
52. Woo IS, Hong SH, Byun JH, Kang JH, Jeon HM, Choi MG. Circulating stromal cell derived factor-1alpha (SDF-1alpha) is predictive of distant metastasis in gastric carcinoma. *Cancer Invest* 2008;26:256-261.
53. Dimberg J, Hugander A, Löfgren S, Wågsäter D. Polymorphism and circulating levels of the chemokine CXCL12 in colorectal cancer patients. *Int J Mol Med* 2007;19:11-15.
54. Bodis S, Haregewoin A. Significantly reduced salivary nitric oxide levels in smokers. *Ann Oncol* 1994;5:371-372.
55. Rasheed MH, Beevi SS, Geetha A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43:333-338.
56. Lee SK, Kim HS, Lee HJ, et al. Dual effect of nitric oxide in immortalized and malignant human oral keratinocytes: induction of apoptosis and differentiation. *J Oral Pathol Med* 2006;35:352-360.
57. Mormon MC, Bogdan A, Cormont S, Touitou Y, Lévi F. Cortisol diurnal variation in blood and saliva of patients with metastatic colorectal cancer: relevance for clinical outcome. *Anticancer Res* 2002;22:1243-1249.
58. Sephton SE, Sapolsky RM, Kraemer HC, Spiegel D. Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:994-1000.
59. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;24:444-448.
60. Flint MS, Kim G, Hood BL, Bateman NW, Stewart NA, Conrads TP. Stress hormones mediate drug resistance to paclitaxel in human breast cancer cells

## Capítulo 1

---

- through a CDK-1-dependent pathway. *Psychoneuroendocrinology*. 2009. In Press.
61. Runnebaum IB, Brüning A. Glucocorticoids inhibit cell death in ovarian cancer and up-regulate caspase inhibitor cIAP2. *Clin Cancer Res* 2005;11:6325-6332.
  62. Nakane T, Szentendrei T, Stern L, Virmani M, Seely J, Kunos G. Effects of IL-1 and cortisol on beta-adrenergic receptors, cell proliferation, and differentiation in cultured human A549 lung tumor cells. *J Immunol* 1990;145:260-266.
  63. Sakayama K, Mashima N, Kidani T, Miyazaki T, Yamamoto H, Masuno H. Effect of cortisol on cell proliferation and the expression of lipoprotein lipase and vascular endothelial growth factor in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61:471-479.
  64. Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y, Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:3003-3009.
  65. Kage T, Mogi M, Katsumata Y, Yamada T, Chino T. Lung and cervical lymph-node metastasis after cortisone enhancement in hamster cheek-pouch carcinogenesis. *Arch Oral Biol* 1988;33:459-461.
  66. Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M, Knerer B, Kornfehl J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head Neck* 2001;23:1049-1055

### **3 Capítulo 2 – Hormônios do estresse aumentam a proliferação celular, estimulam a secreção de interleucina-6 e regulam a produção de óxido nítrico em células de carcinoma espinocelular de boca \***

#### **3.1 Resumo**

**Introdução:** Estudos têm mostrado que o estresse pode influenciar o desenvolvimento e a progressão do câncer. Entretanto, pouco se sabe sobre a interferência de fatores neurohormonais relacionados ao estresse sobre o carcinoma espinocelular (CEC) de boca.

**Proposição:** Neste estudo nós investigamos os efeitos dos hormônios do estresse sobre linhagens celulares derivadas de CEC de boca.

**Material e Método:** Os efeitos da norepinefrina (NE), do isoproterenol e do cortisol sobre a expressão de Interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico (NO) foram investigados nas células derivadas de CEC de boca SCC9 e SCC25. A expressão de IL-6 pelas linhagens celulares foi analisada por PCR em tempo real e a produção da proteína no sobrenadante celular por ELISA. A dosagem de NO no sobrenadante foi feita pelo método de Griess. Os efeitos dos hormônios do estresse sobre a proliferação celular das células SCC9 foram avaliados por MTT. A expressão de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foi analisada por PCR em tempo real nas linhagens SCC9 e SCC25 e em 20 amostras humanas de CEC de boca, 17 de leucoplasia e 15 de mucosa bucal normal.

**Resultados:** Análise por PCR por tempo real indicou expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas linhagens SCC9 e SCC25. NE e isoproterenol aumentaram significativamente a produção de IL-6 nas duas linhagens de CEC bucal. Esses efeitos foram dependentes dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos já que a indução foi inibida por propranolol. O cortisol regulou a expressão de IL-6 nas células SCC9 dependendo da dose usada. Concentrações farmacológicas de cortisol (1000 nM) inibiram a produção de IL-6, enquanto a dose que simula as condições de estresse (10 nM) tendeu a aumentar a produção após uma hora. Estímulos adrenérgicos não

---

\* Texto formatado de acordo com as normas de publicação do periódico Oral Oncology (Anexo D)

## Capítulo 2

---

afetaram a produção de NO. Cortisol a 10 nM aumentou significativamente a produção do metabólito pelas células SCC9, sendo este efeito bloqueado pelo inibidor de glicocorticóide mifepristone. NE a 10 nM após 1 hora e cortisol a 1000 nM após 48 horas induziram proliferação das células SCC9. Todas as amostras de CEC de boca expressaram receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Quantitativamente, a expressão do receptor  $\beta_1$  foi mais marcante nas amostras de CEC de boca em comparação às de leucoplasia e mucosa normal enquanto a expressão do receptor  $\beta_2$  foi ligeiramente menor nas amostras de leucoplasia em relação ao CEC de mucosa normal

**Conclusão:** Esses resultados trazem evidências de que os hormônios relacionados ao estresse psicológico podem influenciar a progressão do CEC de boca.

Palavras-chave: Neoplasias bucais; Neoplasias; Estresse; Hidrocortisona; Norepinefrina; Hormônios.

### 3.2 Abstract

**Background:** Investigations had showed that stress can influence the development and progression of cancer. However little is known about the interference of stress-related neurohormones factors on the oral squamous cell carcinoma (OSCC).

**Purpose:** In this study, we investigated the effects of stress hormones on cell lines derived from OSCC.

**Patients and methods:** The effects of stress-related mediators including norepinefrine (NE), isoproterenol and cortisol on the production of Interleukine-6 (IL-6) and nitric oxide were studied in the cells derived from OSCC SCC9 and SCC25. The IL-6 expression was evaluated by real time PCR and the protein concentration in supernatants using ELISA. The concentration of NO in culture supernatants was measured with Griess reagent. The effects of hormones on cell proliferation of SCC9 cells was evaluated by MTT. The expression of  $\beta$ -adrenergic receptors was evaluated by real time PCR in SCC9 and SCC25 cells and in 20 samples of OSCC, 17 of leukoplakia and 15 of normal oral mucosa samples.

**Results:** Real time PCR studies revealed constitutive expression of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 adrenergic receptors on SCC9 e SCC25 lines. NE and isoproterenol significantly enhanced IL-6 production by two OSCC lines. These effects were blocked by the  $\beta$  antagonist propranolol, supporting a role for  $\beta$ -adrenergic receptors in these effects. Effects of cortisol on IL-6 expression varied according to the cell line and dose. Pharmacological concentrations of cortisol (1000 nM) inhibited IL-6 production, while dose that simulates the stress conditions (10 nM) tended to enhanced expression after one hour. Inhibitory effect of IL-6 production in supernatant on SCC25 was found with cortisol at 1000 nM. Adrenergic stimules do not affect NO production by SCC9 e SCC25. Cortisol (10 nM) significantly enhanced NO production by SCC9 cells. This effect was blocked by glucocorticoid inhibitor Mefipristone. NE (10 nM) after one hour and cortisol (1000 nM) after 48 h stimulate increase cell proliferation of SCC9 cells and these effects were interrupted by antagonists propranolol and mefipristone, respectively. All OSCC samples exhibited expression of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 adrenergic receptors and gene expression profile was different for each receptor in relation leukoplakia and normal oral mucosa samples. Quantitatively  $\beta$ -1 receptor

## Capítulo 2

---

was more marked in OSCC samples than leukoplakia and normal mucosa while  $\beta$ -2 receptor expression was slightly lower in leukoplakia.

**Conclusion:** These findings provide direct experimental evidence that stress hormones can affect OSCC progression.

Keywords: Mouth neoplasms; Neoplasms; Stress; Hydrocortisone; Norepinephrine; Hormones.

### 3.3 Introdução

Pesquisas em animais e estudos epidemiológicos em humanos trazem evidências de que o estresse crônico pode desregular o sistema endócrino e comprometer seriamente as funções imunes e fisiológicas do organismo.<sup>1,2,3</sup> Um crescente número de estudos também tem mostrado que as alterações hormonais e de neurotransmissores resultantes do estresse crônico e de outras condições comportamentais podem influenciar o desenvolvimento e progressão do câncer.<sup>1,4,5</sup> O estresse crônico está associado a uma desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com conseqüente aumento da produção do hormônio cortisol, e com um aumento dos níveis de norepinefrina (NE) e epinefrina (E), catecolaminas liberadas pela medula adrenal e pelos neurônios do Sistema Nervoso Simpático (SNS).<sup>2,3</sup> Os mecanismos envolvidos na desregulação do sistema imune através da ação do cortisol e catecolaminas e conseqüente participação no desenvolvimento do câncer parecem ser bastante complexos e ainda são pouco compreendidos. Células do sistema imune, como linfócitos, monócitos ou macrófagos e granulócitos, apresentam receptores para muitos compostos neuroendócrinos, que determinam alterações em suas atividades citolíticas, de tráfego, proliferativas e de produção de anticorpos.<sup>6</sup>

Estudos mostram que os produtos neurohormonais derivados do estresse crônico podem diminuir a citotoxicidade das células natural killer (NK) por inibição da resposta dessas células para algumas citocinas como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina-2 (IL-2).<sup>7-9</sup> Os hormônios do estresse também têm a capacidade de desregular a produção de diversos outros tipos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que estão relacionadas com o desenvolvimento e progressão do câncer.<sup>1,10,11</sup> Por exemplo, investigações em células de neoplasia maligna de ovário mostraram que catecolaminas (NE e E) e o cortisol aumentam a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinases de matriz (MMPs), produtos que reconhecidamente influenciam a progressão do tumor.<sup>12,13</sup> Outros estudos mostraram que produtos neurohormonais decorrentes do estresse crônico influenciam diretamente o desenvolvimento de neoplasias malignas de pele,<sup>14</sup> mama,<sup>15</sup> pulmão<sup>16</sup> e colon.<sup>17</sup>



## Capítulo 2

---

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina que apresenta um importante papel na angiogênese e progressão tumoral.<sup>18</sup> Evidências mostram que linhagens celulares de CEC de cabeça e pescoço secretam IL-6.<sup>19</sup> Elevados níveis desta citocina são detectados no sangue e na saliva de pacientes com Carcinoma Espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço.<sup>20,21</sup> Estudos *in-vitro* têm mostrado que a IL-6 estimula proliferação celular<sup>19</sup> e participa dos mecanismos de invasão óssea do CEC de boca.<sup>22</sup> Elevada expressão de IL-6 no tecido tumoral e níveis aumentados no plasma de pacientes com CEC de cabeça e pescoço também têm sido associados a comprometimento linfonodal,<sup>23</sup> resistência à radioterapia e quimioterapia<sup>24</sup> e a um pobre prognóstico.<sup>21</sup> A IL-6 têm sido diretamente relacionada ao estresse crônico. Indivíduos que experimentam quadros de estresse exibem níveis circulantes elevados de IL-6.<sup>25</sup> Recentemente, tem sido mostrado que a NE pode aumentar a expressão de IL-6 em melanócitos malignos<sup>26</sup> e em células de carcinoma de ovário.<sup>27</sup>

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gerado por três isótopos da enzima óxido nítrico sintase (NOS): endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) e recentemente alvo de inúmeras pesquisas devido sua participação em vários tipos de câncer.<sup>28</sup> Elevada expressão das NOSs e produção de NO têm sido mostrada no CEC de boca em comparação ao tecido displásico e mucosa normal.<sup>29</sup> Por outro lado, elevados níveis de NO podem induzir apoptose e acúmulo de p53 em células de CEC de boca.<sup>30</sup> Recentemente, Lee et al.<sup>31</sup> mostraram que os efeitos celulares do NO sobre as células derivadas de CEC de boca e queratinócitos podem variar de acordo com sua concentração, sendo que altas concentrações induziram apoptose, enquanto reduzidas concentrações estimularam diferenciação celular. Os possíveis efeitos dos hormônios do estresse sobre a produção de NO por queratinócitos malignos ainda não foram reportados.

São raras ainda as pesquisas que têm investigado a relação dos hormônios do estresse com o CEC de cabeça e pescoço. Recentemente, a presença de receptores  $\beta$ -adrenérgicos para NE e E foi identificada em linhagens celulares de CEC de boca<sup>32</sup> e de esôfago.<sup>33</sup> Essas investigações também mostraram que a proliferação celular dessas linhagens é estimulada por NE e E, respectivamente. Ainda não há evidências de que a expressão de IL-6 e a produção de NO em células de CEC de cabeça e pescoço seja influenciada pelos hormônios do estresse. No presente estudo, nós avaliamos os efeitos dos hormônios relacionados ao estresse

## Capítulo 2

---

sobre a expressão de IL-6, produção de NO e proliferação de células de CEC de boca.

### 3.4 Materiais e Métodos

#### Cultura de células

Para avaliar os efeitos dos hormônios do estresse sobre as células neoplásicas derivadas do câncer de boca, foram utilizadas as linhagens celulares SCC9 e SCC25. As células foram mantidas e expandidas em meio de cultura composto por partes iguais de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e meio de cultura F12 (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab Ltda, Campinas-SP), 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,1% de gentamicina. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Estímulos com os hormônios do estresse

As células das linhagens SCC9 e SCC25 foram semeadas em placas de 24 poços (1,0 x 10<sup>5</sup> células por poço), cultivadas por 48 horas e mantidas por mais 24 horas em meio de cultura DMEM/F12 com concentração reduzida de soro fetal bovino (0,1%). Os hormônios testados na pesquisa foram a NE (Calbiochemical), isoproterenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e cortisol (Sigma-Aldrich). As células foram então tratadas com NE ou isoproterenol a 0, 0.1, 1, 10 e 100 µM ou cortisol a 0, 1, 10, 100 e 1000nM. Para os ensaios de inibição, propranolol (1 µM) foi adicionado à cultura de células 1 hora antes da adição de NE ou isoproterenol a 10 µM. Os períodos de tratamento foram 1, 6 e 24 horas. As concentrações dos hormônios utilizados neste estudo foram definidas levando-se em consideração os níveis fisiológicos que elas poderiam atingir no microambiente tumoral. Níveis circulantes de NE variam entre 10 pM e 1 nM em condições normais.<sup>13</sup> Estudos sugerem que esses níveis podem atingir cerca de 100 nM em condições de estresse, e podem chegar até 10 µM no microambiente de alguns tipos de tumores.<sup>5,13</sup> A concentração de 100 µM representa uma dose muito alta de NE e foi usada para avaliação do perfil dose/resposta das células testadas. Já as concentrações de 10 e 100 nM de cortisol refletem concentrações similares às

## Capítulo 2

---

encontradas em condições de estresse e doses mais elevadas (1000 nM) simulam doses farmacológicas de glicocorticoide.<sup>34</sup>

### **Análise da expressão de IL-6 pelas linhagens de CEC de boca por RT-PCR em tempo real**

RT-PCR em tempo real quantitativo foi utilizada para avaliar a expressão da citocina IL-6 pelas células de CEC bucal SCC9 e SCC25 tratadas com os hormônios relacionados ao estresse. O RNA total foi extraído das células SCC9 e SCC25 com TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). O TRIzol (1ml) foi adicionado em cada poço com as células, agitado, coletado e armazenado a -80°C para posterior extração do RNA. Para cada 1mL da suspensão, 0,2mL de clorofórmio (Sigma) foi adicionado e centrifugado a 15700 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo e 500 uL de isopropanol foi adicionado. As amostras foram agitadas, incubadas *overnight* a -20°C e novamente centrifugadas como previamente descrito. O precipitado foi lavado em etanol 75% e centrifugado. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado seco à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 500 uL de álcool 100% e as amostras foram incubadas *overnight* a -80°C. Em seguida, os sobrenadantes foram novamente descartados e o precipitado seco à temperatura ambiente. Amostras de RNA foram suspendidas em 20uL de água ultrapura livre de RNase e estocadas a -70°C para posterior síntese de DNA complementar (cDNA). A quantidade e qualidade do RNA foram verificadas por espectrofotometria e o cDNA foi sintetizado com *superscript II transcriptase reverse* de acordo com o fabricante (Invitrogen Life Technologies) usando-se 1 µg de RNA total. Níveis de RNAm para os genes estudados foram mensurados pelo sistema Sybr Green no aparelho de PCR em tempo real Step-one (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com recomendações do fabricante. O gene da Beta-actina ( $\beta$ -actina) foi usado como controle endógeno. Padronização da concentração e validação da eficiência da reação foram realizadas para todos os conjuntos de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos para a  $\beta$ -actina foram: sense - 5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG - 3' e antisense - 5' GCATTTGCGGTGGACGAT - 3'. Para a IL-6 foram: sense - 5' AGGGCTCTTCGGCAAATGTA - 3' e antisense -

## Capítulo 2

---

5' GAAGGAATGCCCATTAACAACAA – 3'. Reações foram realizadas com volume final de 20  $\mu$ l e cada amostra foi corrida em duplicata. As concentrações finais dos oligonucleotídeos nos poços foram:  $\beta$ -actina 200 nM e IL-6 300 nM. As condições térmicas de ciclagem usadas foram universais de acordo com as recomendações do fabricante. Os níveis de expressão de cada gene em cada amostra foram normalizados para os níveis de RNAm da  $\beta$ -actina. A quantidade relativa (RQ) de RNAm para cada gene alvo foi calculada utilizando o método de  $C_T$  comparativo. Os resultados foram apresentados em quantidade de vezes de aumento ou redução da expressão do gene alvo nas células estimuladas com os hormônios em relação às células não tratadas (controle).

### **Avaliação da produção de IL-6 no sobrenadante da cultura pelas linhagens de CEC de boca**

A quantidade de IL-6 no sobrenadante celular produzida pelas linhagens SCC9 e SCC25 após tratamento com os hormônios do estresse, foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche. Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 16-18 horas a 4°C, com anticorpo anti-IL-6 (Anti-human IL-6 Antibody, R&D Systems) diluído em tampão de fosfato de cálcio. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS 1% , contendo 0,5% de Tween 20 e incubadas durante 2 horas, em temperatura ambiente, com PBS 1% contendo soroalbumina bovina 1% (BSA). As placas, então, foram lavadas e incubadas com 50  $\mu$ l de sobrenadante e com IL-6 recombinante (para a curva padrão), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotilado (Biotinylated Anti-human-IL-6 Antibody, R&D Systems) por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem e secagem foram incubadas com solução de estreptoavidina (Sigma<sup>®</sup>) com PBS 1% contendo soroalbumina bovina 1% (BSA) por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e o substrato tetrametilbenzidina (Invitrogen<sup>®</sup>) foi adicionado conforme instruções do fabricante. Após 30 minutos, a solução de paralisação da reação (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) foi adicionada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450 nm.

### **Determinação da produção de NO no sobrenadante pelas linhagens de CEC de boca**

A análise da presença de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) total, como indicador das concentrações de NO, no sobrenadante da cultura das células SCC9 e SCC25, foi realizada pelo método de Griess.<sup>35</sup> Em placas de 96 poços, 50  $\mu\text{l}$  das amostras de sobrenadante foram incubadas com igual volume do reagente de Griess por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o índice de densidade óptica foi analisado por espectrofotometria (540nm). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2$  comparados com uma curva padrão realizada com nitrito de sódio em concentrações de 200 a 0.78  $\mu\text{M}$ .

### **Análise dos efeitos dos hormônios do estresse sobre a proliferação das células SCC9**

Células de CEC humano SCC9 ( $2 \times 10^3$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas em 100  $\mu\text{l}$  de meio cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após atingirem 20% de confluência, as células foram mantidas em meio de cultura com concentrações reduzidas de soro fetal por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com NE, isoproterenol ou cortisol nas mesmas concentrações utilizadas para os experimentos de expressão gênica. Ensaios de inibição também foram realizados com propranolol. Uma solução foi feita, dissolvendo 5mg de MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolium] (Sigma) em 1ml de PBS, e então filtrada e esterilizada utilizando-se filtro Milipore 0,22  $\mu\text{m}$ . 100  $\mu\text{l}$  de uma solução composta por 10  $\mu\text{l}$  de MTT diluído e 90  $\mu\text{l}$  de meio de cultura com 0,1% de soro fetal foi adicionado em cada poço após 6, 24 e 48 horas dos estímulos com os hormônios. As células SCC9 permaneceram incubadas por 4 horas a 37°C em 5% de  $\text{CO}_2$ . A solução de MTT foi aspirada e álcool isopropílico (100  $\mu\text{l}$  por poço) foi adicionado. A placa foi então agitada por 30 minutos em temperatura ambiente para dissolver os cristais de cor azul que coraram as mitocôndrias. Quantificação colorimétrica foi determinada por espectrofotometria com comprimento de onda ajustado para 570 nm. Os experimentos foram conduzidos com 6 replicatas e cada ensaio foi repetido 3 vezes.

### **Avaliação da expressão de receptores adrenérgicos $\beta_1$ e $\beta_2$ em linhagens celulares de CEC de boca SCC9 e SCC25**

Para avaliar se as linhagens de células SCC9 e SCC25 expressam RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  a técnica de PCR em tempo real foi realizada conforme descrita anteriormente. Os oligonucleotídeos para o receptor  $\beta_1$ -adrenérgico foram: sense - 5'- GCGTGTGATGCATCTTTAGATTTT – 3', antisense - 5'- CCTAACCCACCCATCTTCCA – 3'. Para o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico foram: sense - 5'- TTGAAGGCCTATGGGAATGG – 3', antisense - 5'- TCCACTCTGCTCCCCTGTGT – 3'. O gene da  $\beta$ -actina foi utilizado como controle endógeno.

### **Análise da expressão de receptores adrenérgicos $\beta_1$ e $\beta_2$ em amostras de mucosa bucal normal, leucoplasia bucal e CEC de boca.**

Para avaliar se CECs de boca expressam receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , 20 amostras tumorais foram coletadas de pacientes portadores de CEC de boca não tratados. Todas peças foram coletadas de forma padronizada no momento da biópsia. Após removidas do leito cirúrgico e manipuladas com material estéril, as amostras eram lavadas com solução salina, armazenadas em TRIzol (Invitrogen®) e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido para transporte até o freezer - 80 °C, onde ficaram estocadas até serem processadas. Para análise comparativa, 17 amostras de leucoplasia bucal e 15 amostras de mucosa bucal normal foram coletadas e armazenadas seguindo o mesmo protocolo. As amostras foram então descongeladas em TRIzol e trituradas em tubos livres de RNAses com triturador elétrico (Positron). Em seguida, o RNA total das amostras foi extraído, o cDNA sintetizado e a PCR em tempo real foi realizada conforme técnica já descrita para os ensaios de expressão gênica. Os oligonucleotídeos para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foram os mesmos utilizados na avaliação da expressão das células SCC9 e SCC25.

## Capítulo 2

---

As características clínicas dos pacientes e voluntários portadores das amostras utilizadas para o estudo da expressão dos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  estão descritas no ANEXO A.

### **Análise estatística**

Os dados dos ensaios da cultura de células foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de correção de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Dados da análise quantitativa do PCR em tempo real foram apresentados em quantas vezes a expressão do gene alvo aumentou ou diminuiu em relação ao controle (células não tratadas).

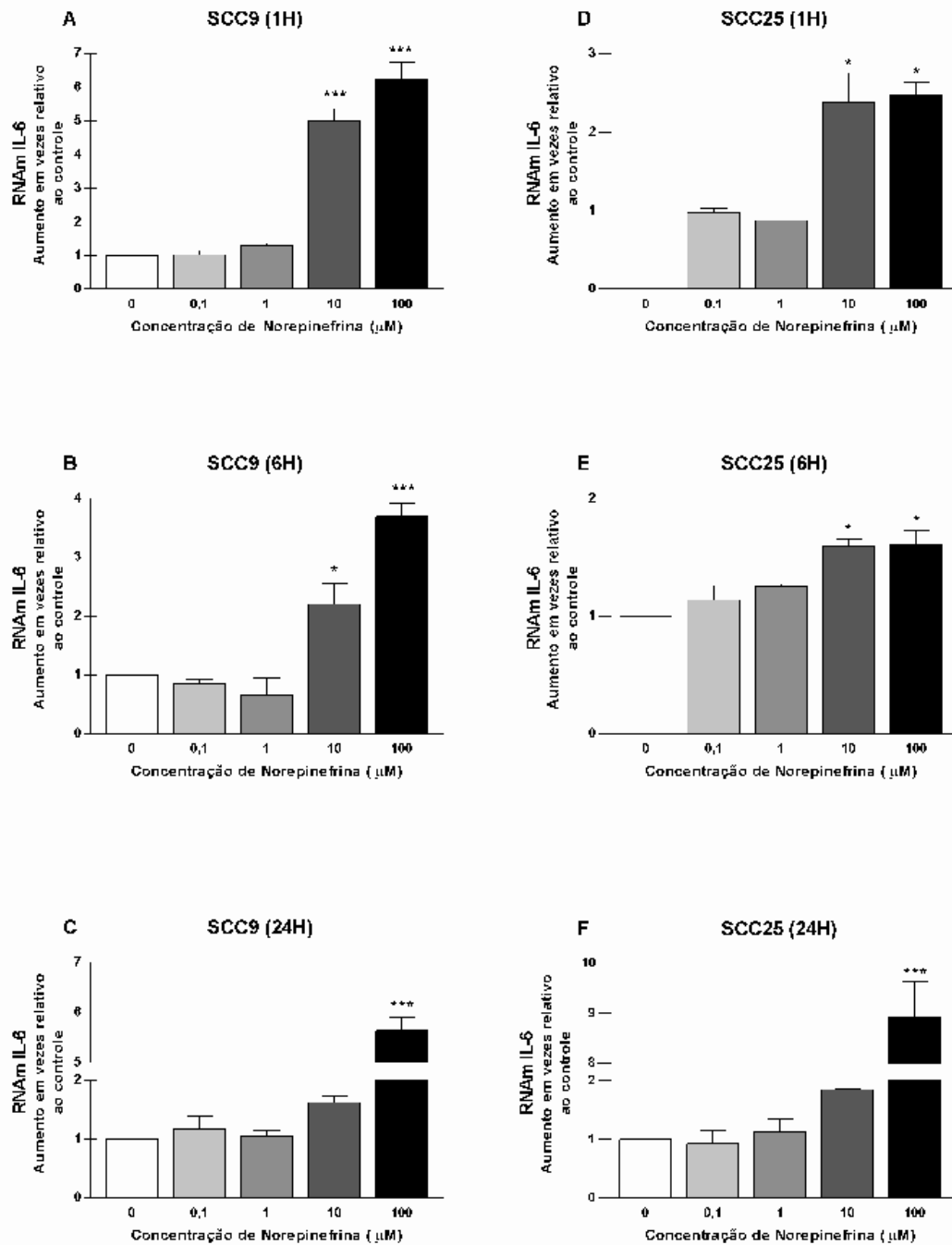


### 3.5 Resultados

#### **Hormônios do estresse regulam a expressão de RNAm para IL-6 em células de CEC de boca SCC9 e SCC25.**

Para avaliar os efeitos dos hormônios do estresse sobre a expressão de IL-6 em linhagem celular de carcinoma de boca, células SCC9 foram estimuladas com concentrações crescentes de norepinefrina, isoproterenol e cortisol e a expressão de RNAm para IL-6 foi analisada por PCR em tempo real. Em todos os períodos avaliados (1, 6 e 24 horas), estímulos da SCC9 e SCC25 com concentrações aumentadas de NE (10 uM), que refletem níveis fisiológicos de estresse, determinaram aumento da expressão de RNAm para IL-6. O pico da expressão gênica foi verificado logo após 1 hora do tratamento com NE a 10 uM, com um aumento de 5 vezes na expressão de RNAm para IL-6 nas células SCC9 em relação às células não tratadas ( $p < 0,001$ ) e 2,3 vezes nas células SCC25 ( $p < 0,05$ ) (Figura 1A e 1D). Dose mais elevada de NE (100 uM) determinou um aumento de 6 vezes ( $p < 0,001$ ) e 2,5 vezes ( $p < 0,05$ ) na expressão de IL-6 nas células SCC9 e SCC25, respectivamente. Embora com menor intensidade um aumento significativo na expressão de RNAm para IL-6 nas duas linhagens também foi verificado após 6 horas do estímulo (Figura 1B e 1E). Após 24 horas, houve redução na produção de RNAm para IL-6 quando as células foram tratadas com NE 10uM, e somente NE 100uM manteve uma super-regulação dessa expressão ( $p < 0,001$ ) (Figura 1C e 1F).

## Capítulo 2



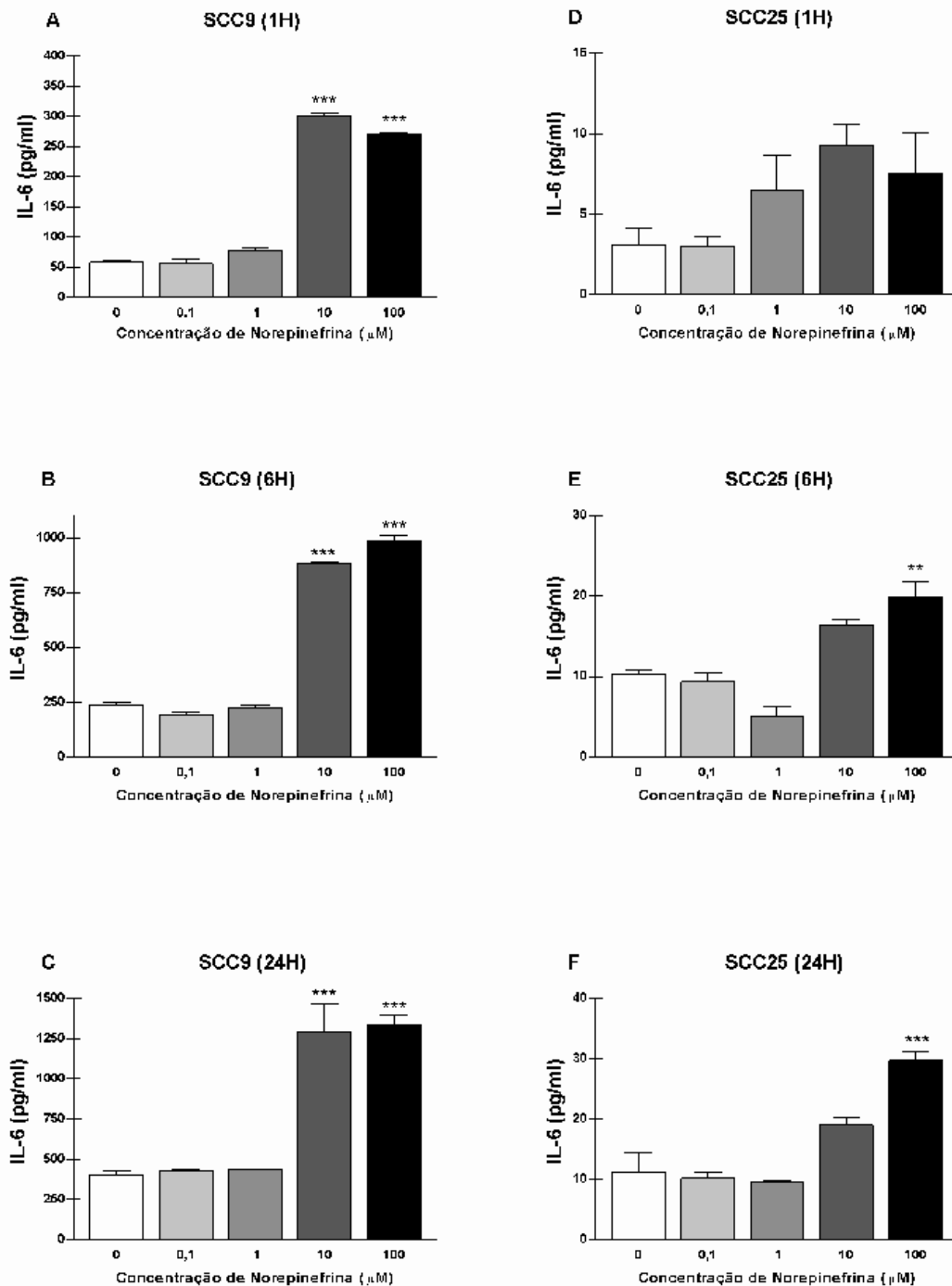
**Figura 1** Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100 μM de Norepinefrina. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido de correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## Capítulo 2

---

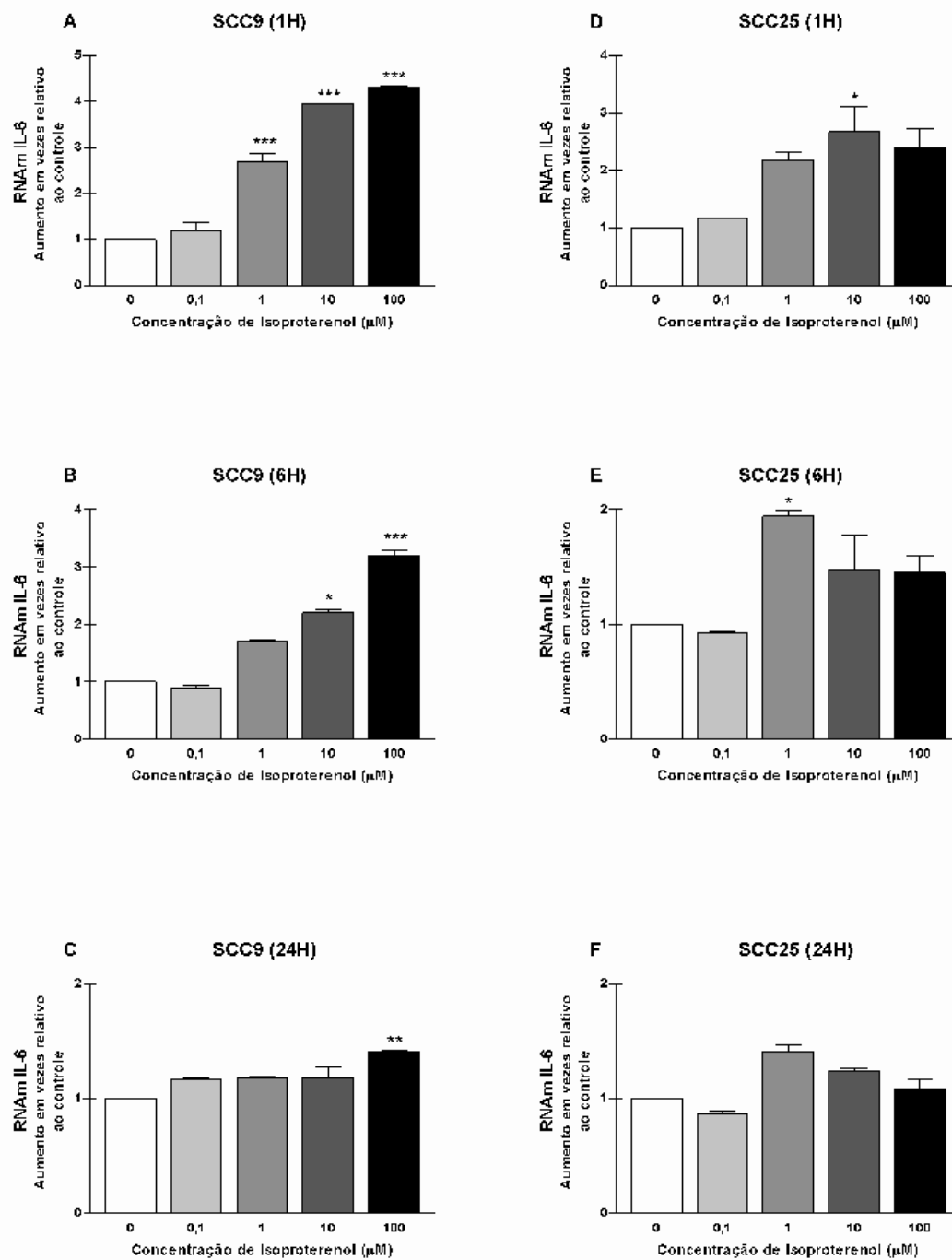
Os resultados dos efeitos de NE sobre a produção de IL-6 pelas células tumorais SCC9 e SCC25 foram confirmados pelos ensaios de mensuração da citocina liberada pelas células no sobrenadante da cultura. Alta quantidade de IL-6 foi encontrada nos 3 períodos avaliados em ambas linhagens quando estimuladas com 10 e 100 uM de NE (Figura 2). Como observado nos ensaios de expressão gênica, a quantidade de IL-6 produzida pela linhagem SCC9, com ou sem estímulo, foi cerca de 25 vezes maior do que a quantidade produzida pelas células SCC25. O efeito do hormônio sintético isoproterenol sobre a expressão de IL-6 nas células SCC9 e SCC25 foi semelhante ao da NE. O tratamento das células SCC9 com isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, promoveu, após 1 hora, um aumento dose-dependente da expressão de RNAm para IL-6. Tanto isoproterenol a 1uM (aumento de 2,7 vezes,  $p < 0,001$ ), como a 10 uM (4,0 vezes,  $p < 0,001$ ) e 100uM (4,4 vezes,  $p < 0,001$ ) aumentaram significativamente os níveis de RNAm para IL-6 (Figura 3A). Embora menor, esse aumento em relação ao controle foi mantido após 6 horas (NE 10 uM e NE 100uM) e não se manteve após 24 horas para as células tratadas com 1 e 10 uM, cujos índices de expressão de IL-6 se aproximaram aos das células não tratadas (Figuras 3B e 3C). Similarmente ao observado na linhagem SCC9, a expressão de IL-6 nas células SCC25 também foi elevada após estímulos com isoproterenol. Porém, nos períodos de 6 horas e 24 horas, apesar das doses de 10 e 100 uM aumentarem a expressão de IL-6 ( $p > 0,05$ ), o pico de aumento significativo foi com a dose de 1 uM (Figuras 3E e 3F). Os efeitos estimulatórios do isoproterenol sobre a expressão de IL-6 nas linhagens SCC9 e SCC25 foram confirmados pela quantificação da proteína no sobrenadante celular (Figura 4).

## Capítulo 2



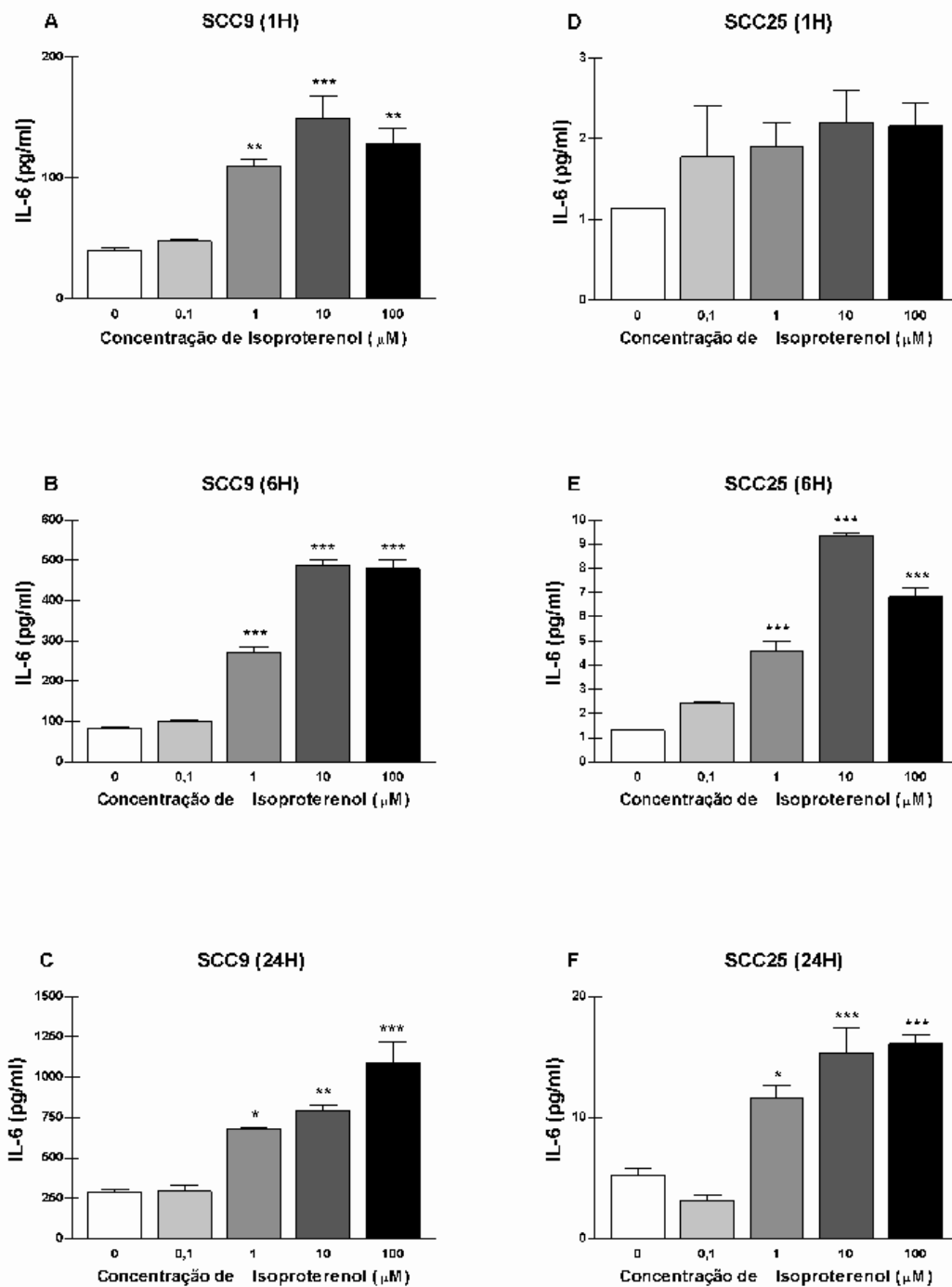
**Figura 2** Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25, após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  de Norepinefrina. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi  $<0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## Capítulo 2



**Figura 3** Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25, após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100 μM de Isoproterenol. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

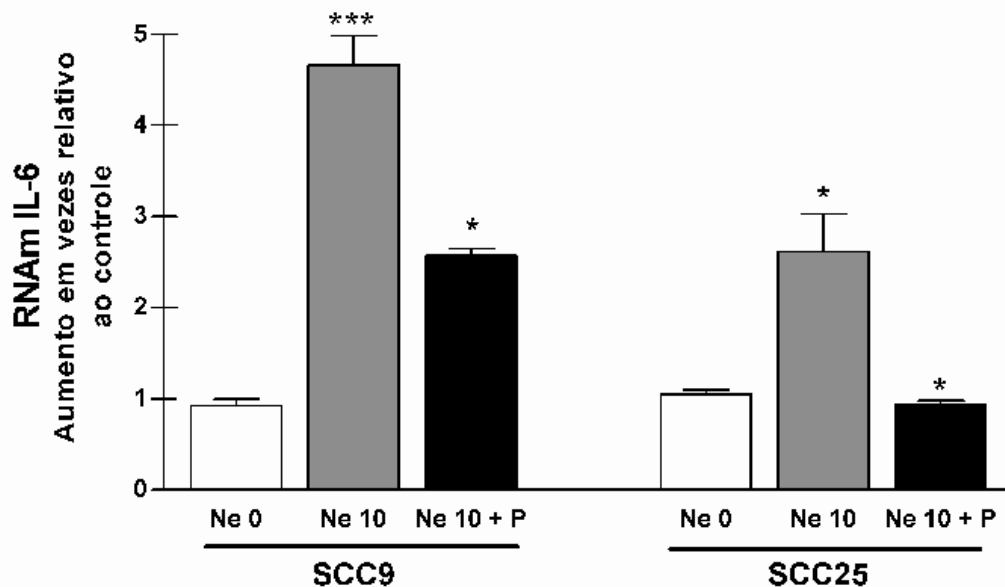
## Capítulo 2



**Figura 4** Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25, após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0.1, 1, 10 e 100 μM de Isoproterenol. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas) que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## Capítulo 2

Para determinar se o aumento da expressão de RNAm para IL-6 era regulado por meio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, células SCC9 e SCC25 foram tratadas com 1  $\mu$ M de propranolol, um antagonista não específico de receptor  $\beta$ -adrenérgico, 1 hora antes do estímulo com 10  $\mu$ M de NE ou isoproterenol. Como mostrado na figura 5 a indução de RNAm para IL-6 foi bloqueada pelo propranolol.



**Figura 5** Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 e SCC25 após 1 hora de estímulo com 10  $\mu$ M de norepinefrina e com tratamento com 1  $\mu$ M de propranolol (Ne 10 + P) 1 hora antes do estímulo com 10  $\mu$ M de norepinefrina em comparação às células não tratadas (Ne 0). Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação a expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

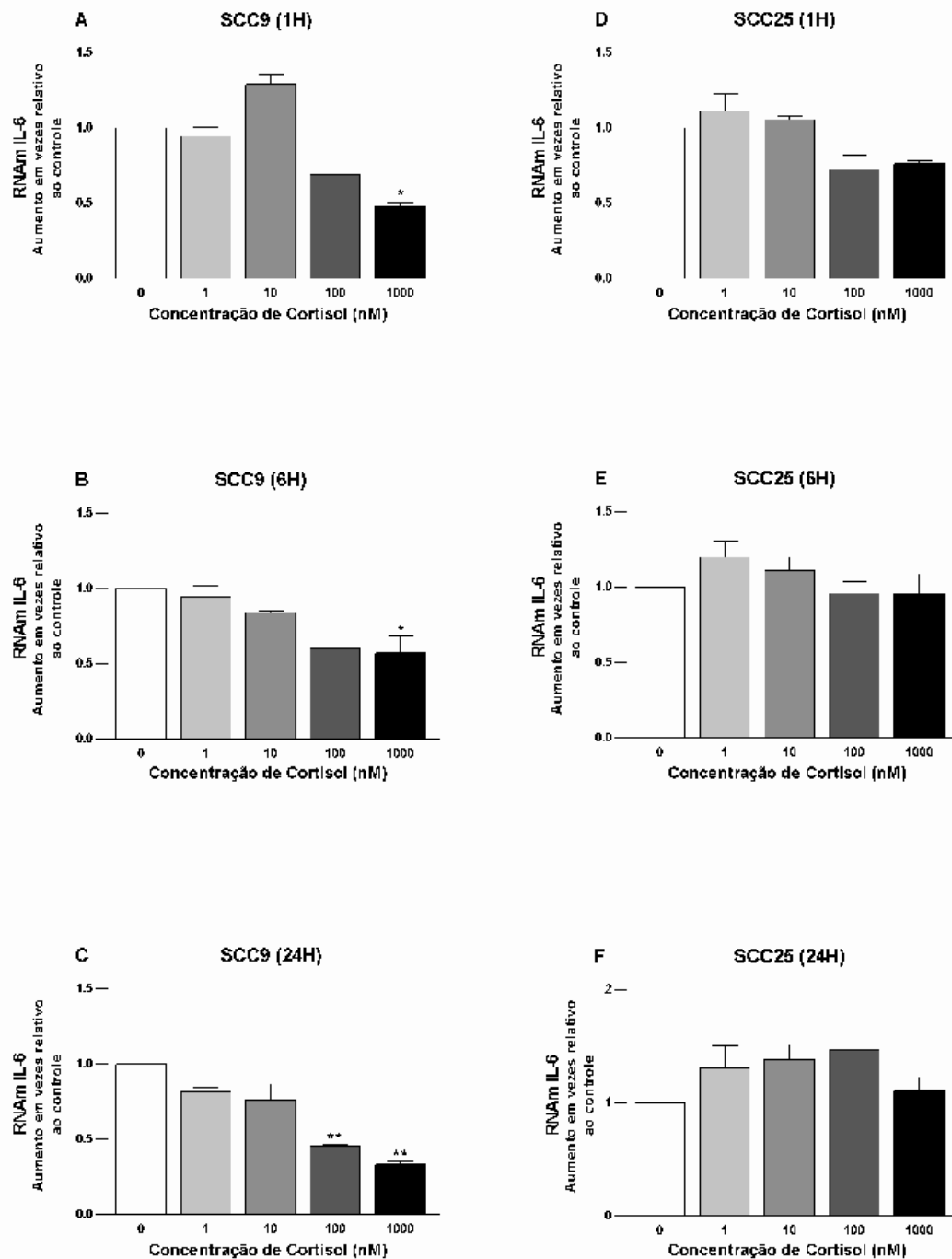
## Capítulo 2

---

O padrão de expressão de RNAm para IL-6, após tratamento com o hormônio cortisol, foi diferente do encontrado para a NE e Isoproterenol, com efeitos variados dependendo da linhagem celular e da concentração de cortisol testada. Para a linhagem SCC9, as concentrações mais elevadas de cortisol (100 nM e 1000 nM) determinaram, em geral, uma redução na expressão de RNAm para IL-6 (Figura 6). Essa redução ocorreu para todos os períodos testados com o cortisol a 1000 nM ( $p < 0,05$ ). Para o cortisol a 100 nM, a diminuição foi mais evidente após 24 horas do tratamento ( $p < 0,01$ ) (Figuras 6A, 6B e 6C). Apesar da nítida capacidade do cortisol, quando em doses mais elevadas, em reduzir a expressão de RNAm para IL-6, a dose de 10 nM aumentou a expressão de IL-6 depois da primeira hora de estímulo, porém sem significância estatística. (Figura 6A). Os ensaios com o sobrenadante da linhagem SCC9 tiveram resultados muito similares ao da PCR (Figura 7A, B e C). A linhagem SCC25 apresentou diminuição da quantidade de IL-6 no sobrenadante após 6 horas do tratamento com cortisol a 1000 nM (Figura 7E), mas esta indução não foi significativa no experimento de expressão gênica. A influência do cortisol, na expressão de RNAm para IL-6, foi nitidamente inibida quando as células foram tratadas, 1 hora antes do estímulo, com 100  $\mu$ M de Mefipristone, um antagonista de receptor de glicocorticoide (dados não mostrados).

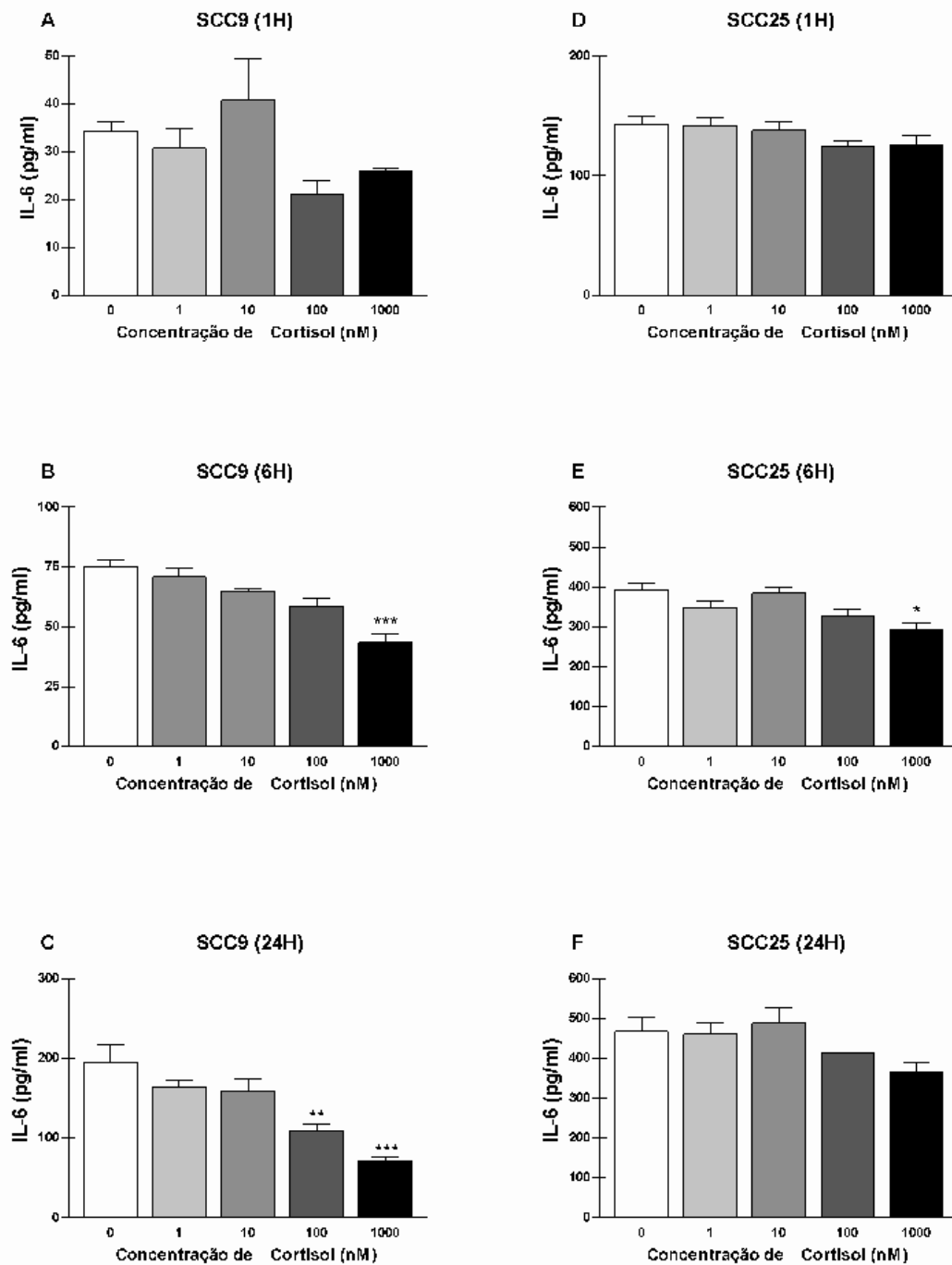


## Capítulo 2



**Figura 6** Expressão de RNAm para IL-6 pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de cortisol. Níveis de RNAm para IL-6 foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), que foi fixada no valor = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## Capítulo 2

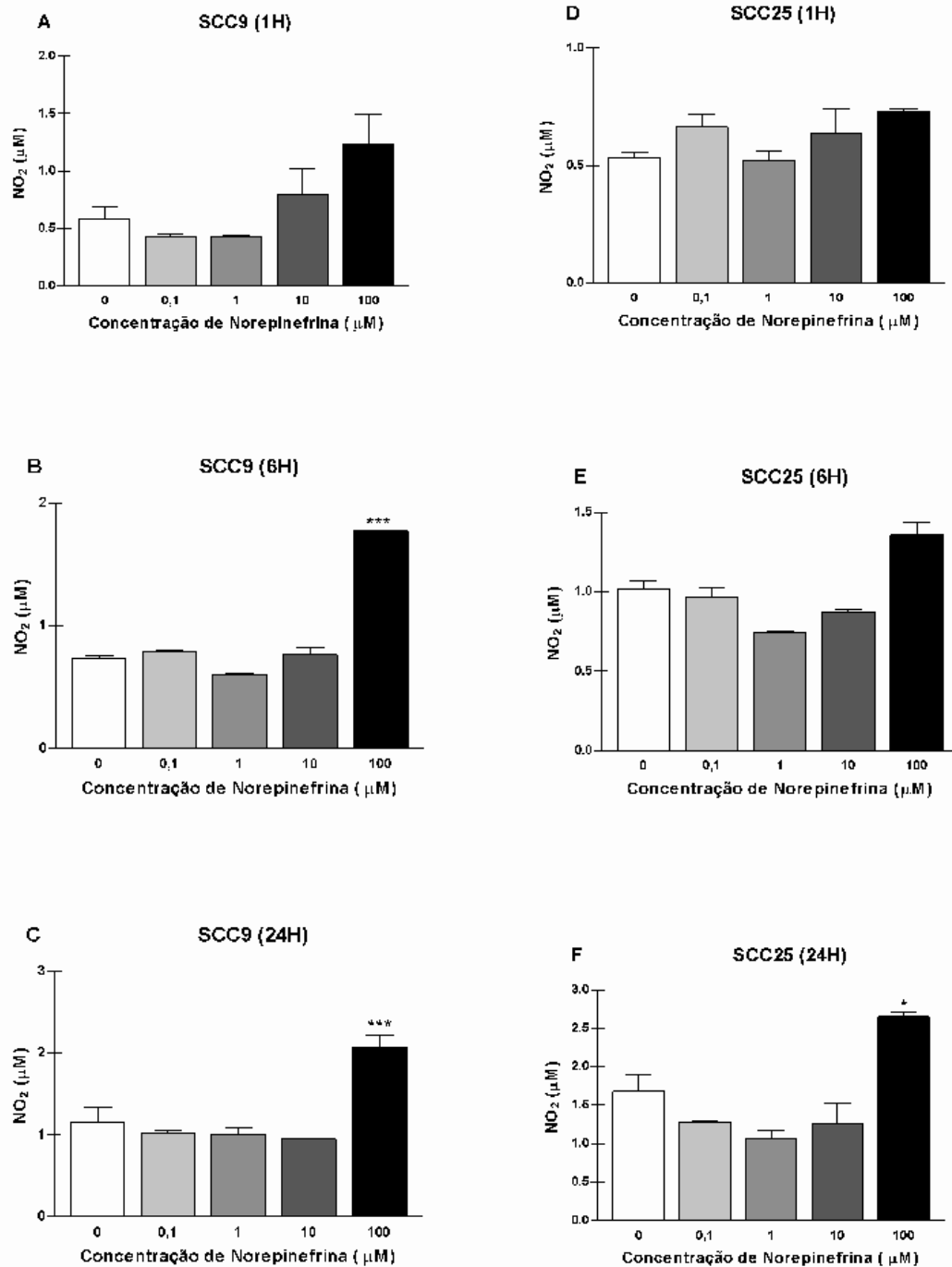


**Figura 7** Quantidade de IL-6 no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9, após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de cortisol. Níveis de IL-6 foram analisados por ELISA. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para IL-6 aumentou ou diminuiu em relação à expressão apresentada pelo controle (células não tratadas), cujo valor foi = 1 em toda a série experimental. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi <0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### **Produção de NO pelas células SCC9 e SCC25 após estímulo com os hormônios do estresse**

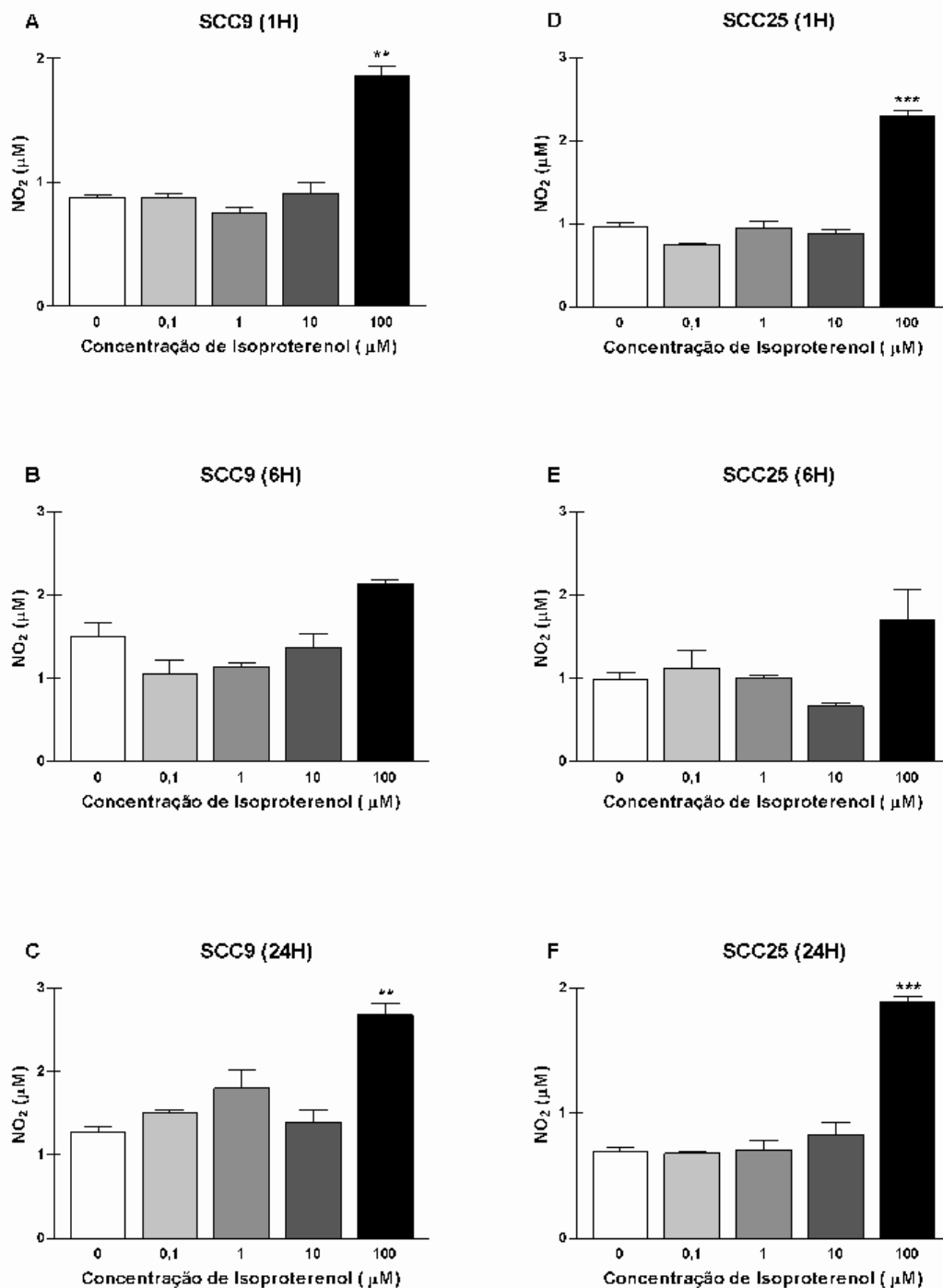
Os níveis de NO, na forma de nitrito, foram determinados no sobrenadante das células SCC9 e SCC25 após serem estimuladas com NE, isoproterenol e cortisol. Para os estímulos com NE, apesar de um aumento de cerca de 50% na produção de nitrito pelas células SCC9 após a primeira hora, resultados significantes para aumento da substância só foram visualizados com a concentração de 100  $\mu\text{M}$  após 6 e 24 horas para a linhagem SCC9 e 24 horas para a SCC25 (Figura 8). O mesmo foi observado após o tratamento com isoproterenol (Figura 9). Cortisol em concentração que simula condições de estresse (10 nM) determinou, após 6 horas, aumento da concentração de nitrito em relação às células não tratadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B). Esse efeito foi inibido quando as células foram previamente tratadas com o inibidor de glicocorticoide mifepristone (dados não mostrados). Doses farmacológicas de cortisol (1000 nM) diminuíram a quantidade de nitrito em todos os períodos estudados, mas os resultados não foram significativos ( $p > 0,05$ ) (Figuras 10 D, E e F).

## Capítulo 2



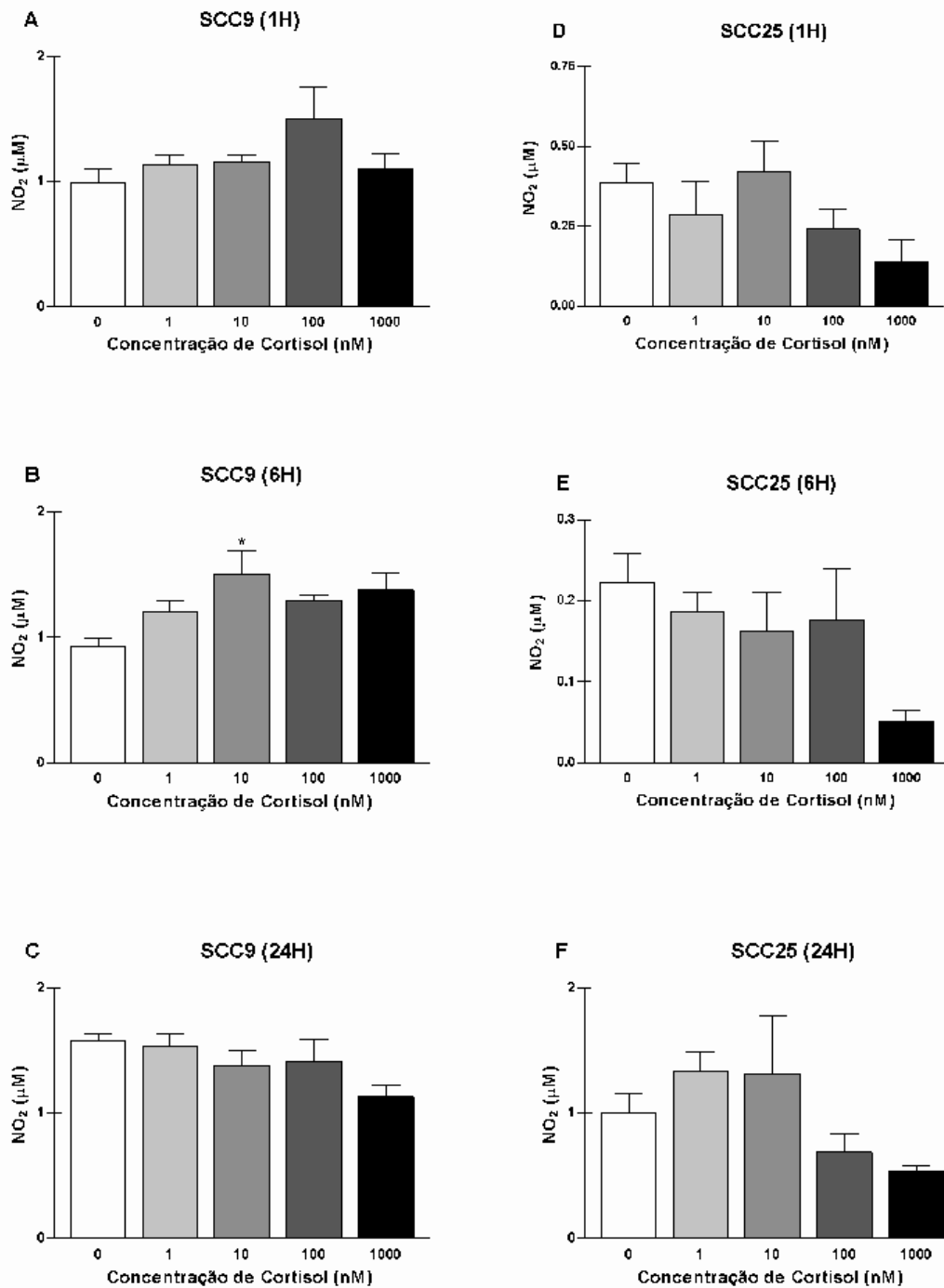
**Figura 8** Quantidade de NO na forma de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  de Norepinefrina. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espectofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi  $<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

## Capítulo 2



**Figura 9** Quantidade de NO na forma de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9, após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  de isoproterenol. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espectofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi  $<0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## Capítulo 2

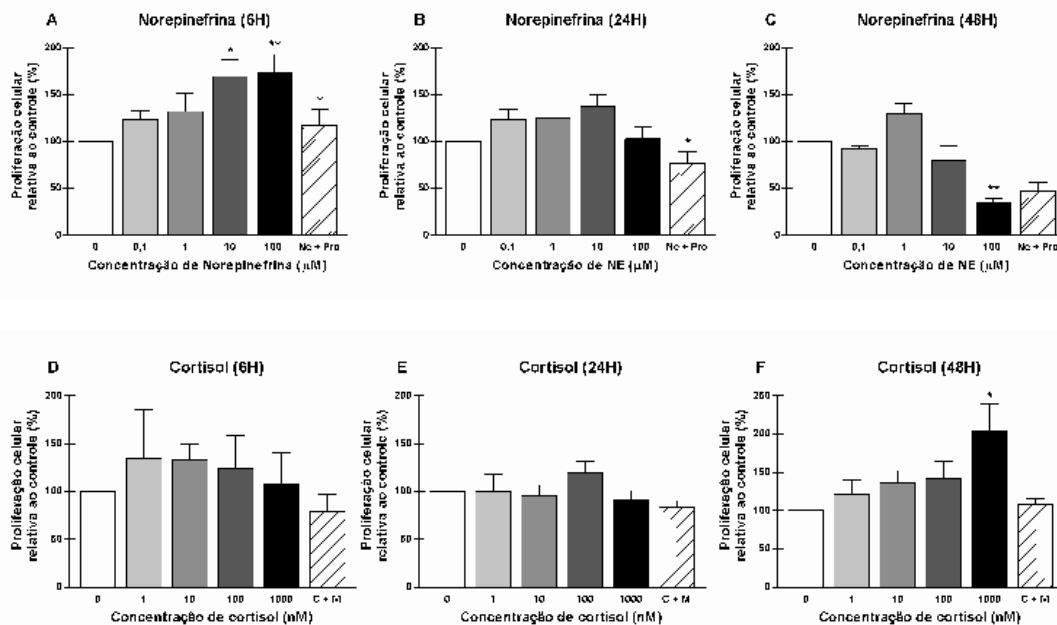


**Figura 10** Quantidade de NO na forma de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) no sobrenadante de cultura produzida pelas células SCC9 após 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C) e pelas células SCC25 após 1 hora (D), 6 horas (E) e 24 horas (F) de estímulo com 0, 1, 10, 100 e 1000  $\text{nM}$  de cortisol. Níveis de nitrito foram analisados pelo método de Griess e mensurados por espectofotometria. Dados são apresentados em concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em relação às células não tratadas. Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o p foi  $<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

## Capítulo 2

### Proliferação de células de CEC de boca humano é influenciada pelos hormônios do estresse

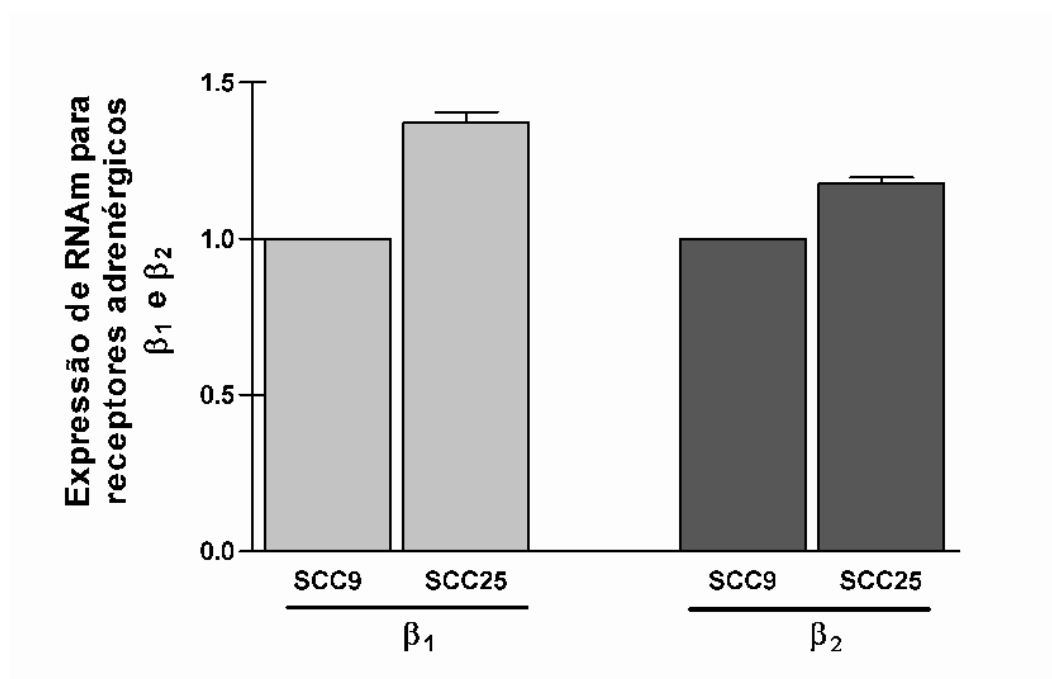
Nós também avaliamos se os hormônios do estresse poderiam estimular a proliferação de células de CEC de boca humano SCC9. A NE (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) induziu aumento da proliferação de células SCC9 em quase 2 vezes ( $p < 0,05$ ) após 6 horas de estímulo (Figura 11A). Esse potencial para indução da proliferação foi diminuindo nos períodos seguintes (24 e 48 horas) (Figuras 11B e 11C). Alta concentração de NE (100  $\mu\text{M}$ ), após 48 horas, inibiu a proliferação celular (Figura 11C). Em todos os períodos testados, o antagonista propranolol inibiu a proliferação das células SCC9 estimuladas com NE (Figura 11). Apesar de a tendência do cortisol em aumentar a proliferação das células SCC9 (principalmente após o período inicial de uma hora), somente concentração farmacológica do hormônio (1000 nM) determinou, após 48 horas, aumento significativo do número de células ( $p < 0,05$ ) (Figuras 11D, 11E e 11F). O Isoproterenol não determinou alterações significativas na proliferação de células SCC9 (dados não mostrados).



**Figura 11** Proliferação das células SCC9 após 6 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C) de estímulo com 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  de norepinefrina e após 6 horas (D), 24 horas (E) e 48 horas (F). Dados são apresentados em porcentagem de aumento ou diminuição da viabilidade celular em relação ao controle (células não tratadas). Todas as barras representam três experimentos realizados com 6 replicatas. Análise feita pelo teste ANOVA seguido por correção de Bonferroni. \* indica diferenças estatísticas em comparação ao controle quando o P foi  $< 0,05$ . Ne: Norepinefrina (10  $\mu\text{M}$ ), P: Propranolol (1  $\mu\text{M}$ ), C: cortisol (1000 nM), M: Mefipristone (100  $\mu\text{M}$ ).

## Linhagens SCC9 e SCC25 expressam RNAm para os receptores adrenérgicos $\beta_1$ e $\beta_2$ .

Análise por PCR em tempo real confirmou que as células SCC9 e SCC25 expressam os dois tipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Análise quantitativa mostrou que esta expressão foi ligeiramente maior na linhagem SCC25 em relação à linhagem SCC9 (Figura 12).

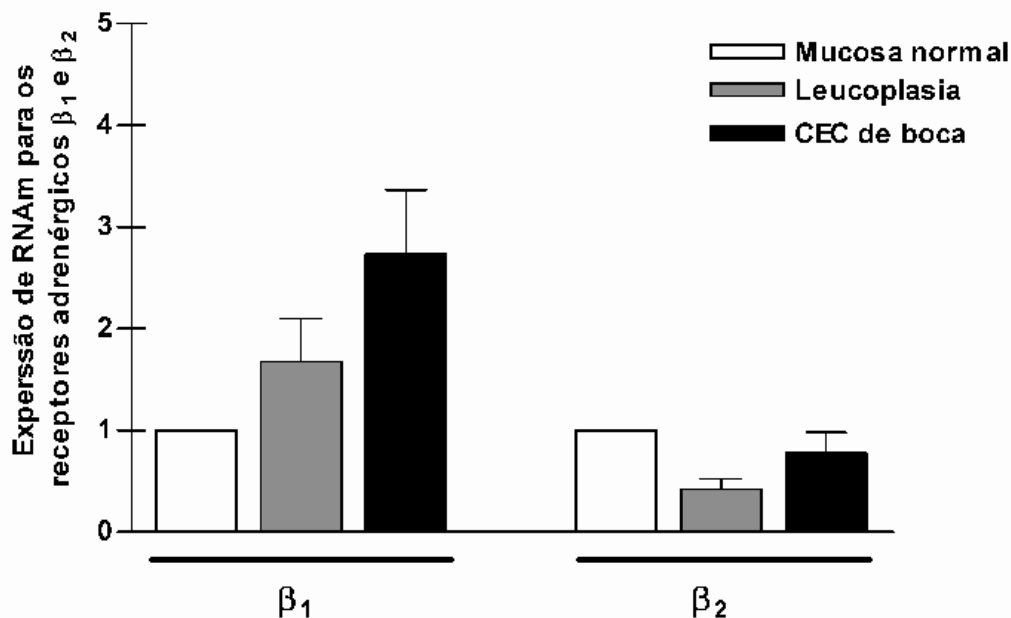


**Figura 12** Expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  pelas linhagens celulares SCC9 e SCC25. Expressão de RNAm para os receptores foram analisados por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  da linhagem SCC25 diferiu comparada com a SCC9 (média da quantidade relativa fixada no valor = 1). Todas as barras representam três experimentos realizados em duplicata.



## Receptores adrenérgicos $\beta_1$ e $\beta_2$ são expressos por CEC de boca e apresentam distinto perfil de expressão de acordo com o tipo do receptor.

A expressão dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos também foi avaliada em amostras de CEC de boca, em amostras de leucoplasia bucal, e em peças de mucosa normal. Tanto o receptor adrenérgico  $\beta_1$  quanto o receptor  $\beta_2$  foram expressos nas 20 amostras de CEC bucal. Das 17 amostras de leucoplasia, 5 foram negativas para o receptor  $\beta_1$  e uma para o  $\beta_2$ . Das 15 amostras de mucosa bucal normal 3 não expressaram o receptor  $\beta_1$  e uma foi negativa para o receptor  $\beta_2$ . Quantitativamente, a expressão do receptor  $\beta_1$  nas amostras de CEC foi 2,7 vezes maior que as amostras de mucosa normal, enquanto nas amostras de leucoplasia, o aumento foi de 1,6 vezes (Figura 13). Inversamente, para o receptor  $\beta_2$  houve uma tendência das amostras de leucoplasia expressarem menos o receptor do que as amostras de mucosa normal e os tumores de boca (Figura 13). Os perfis de expressão dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos para cada amostra estudada podem ser melhor observados nas figuras 14 e 15.

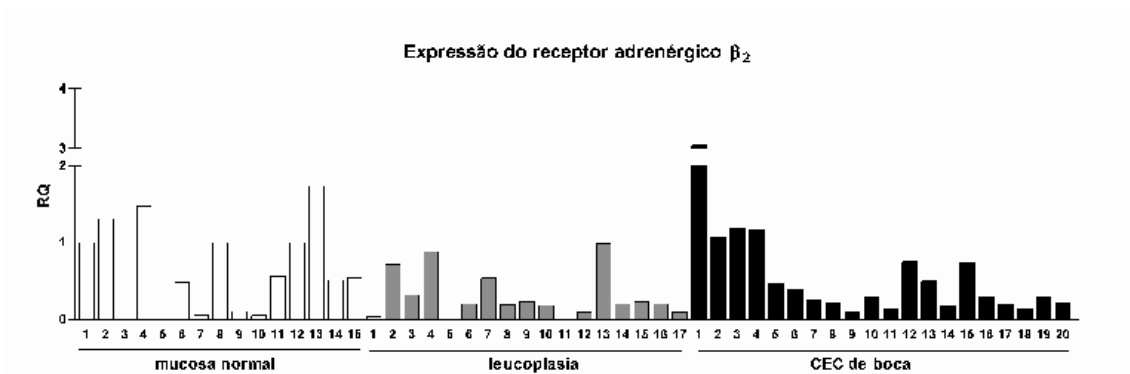


**Figura 13** Expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  em amostras de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para os receptores foi analisada por PCR em tempo real. Dados são apresentados em quantas vezes a média da quantidade relativa de expressão de RNAm para os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  nas amostras de leucoplasia e de CEC de boca diferiram das amostras de mucosa bucal normal.

## Capítulo 2



**Figura 14** Perfil da expressão de RNAm para o receptor adrenérgico  $\beta_1$  em cada uma das amostras estudadas. Cada número representa um paciente dos grupos de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para o receptor  $\beta_1$  foi analisada por PCR em tempo real.



**Figura 15** Perfil da expressão de RNAm para o receptor adrenérgico  $\beta_2$  em cada uma das amostras estudadas. Cada número representa um paciente dos grupos de mucosa normal, leucoplasia e CEC de boca. Expressão de RNAm para o receptor  $\beta_2$  foi analisada por PCR em tempo real.

### 3.6 Discussão

Neste estudo demonstramos fortes evidências de que células de CEC de boca sofrem a influência de mediadores neurohormonais. Os resultados indicam que mediadores relacionados ao estresse (NE e isoproterenol) podem aumentar diretamente a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em linhagens celulares de CEC bucal SCC9 e SCC25. Estes efeitos são mediados via receptores  $\beta$ -adrenérgicos já que o propranolol, um antagonista de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , inibiu a expressão de RNAm para IL-6. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mostrar que os hormônios do estresse regulam a expressão de IL-6 em células de CEC derivadas de uma neoplasia maligna de boca. Estudos recentes em células de melanoma<sup>26</sup> e carcinoma de ovário<sup>27</sup> também mostraram que nesses tumores a NE também super-regulou a expressão de IL-6. O aumento da expressão do gene da IL-6 pela NE também tem sido relatado em miócitos<sup>36</sup> e em células epiteliais do ducto pancreático.<sup>37</sup>

As doses efetivas de NE e isoproterenol, que determinaram aumento significativo da expressão de RNAm para IL-6 e produção da proteína no sobrenadante nas duas linhagens estudadas, foram doses de 10 e 100  $\mu$ M. A dose de 10  $\mu$ M representa uma concentração aproximada que catecolaminas adrenérgicas podem atingir no organismo quando este se encontra sob estado de estresse. A dose de 100  $\mu$ M representa uma extrapolação dessa concentração e foi utilizada a fim de observarmos a reação celular frente a altas doses dessas catecolaminas. Interessantemente, a indução de RNAm para IL-6 foi mais acentuada em um período bastante precoce de estímulo (uma hora), indicando um metabolismo muito rápido dos hormônios adrenérgicos pelas células de CEC bucal SCC9 e SCC25. Tal fato é reforçado pela drástica queda desses efeitos após 24 horas de tratamento. Nilsson et al.<sup>27</sup> constataram que o pico de produção de RNAm para IL-6 em células de carcinoma de ovário se deu após 6 horas de estímulo com NE. Avaliação, após 3 horas de tratamento, mostrou mínima elevação na produção de IL-6 contrastando com o abrupto aumento na produção da citocina que encontramos logo após 1 hora nas linhagens de CEC bucal. Esse dado indica que diferentes tumores provavelmente apresentam perfis de sensibilidade variada à NE.

Semelhantemente ao que ocorreu com a produção de RNAm para IL-6, foi observada significativa indução de proliferação das células SCC9 após estímulo com

## Capítulo 2

---

NE em concentração que simula, no organismo, condições de estresse (10  $\mu$ M). Essa indução do potencial proliferativo das células de CEC bucal ocorreu via receptor  $\beta$ -adrenérgico e foi maior após 6 horas quando comparado aos períodos de 24 e 48 horas, indicando que a influência da NE sobre as moléculas do ciclo celular também ocorre de maneira rápida. A influência de mediadores  $\beta$ -adrenérgicos aumentando a proliferação celular de células neoplásicas malignas tem sido relatada em diversos tipos de câncer, incluindo tumores de pulmão,<sup>38</sup> pâncreas,<sup>39</sup> mama<sup>40</sup> e estômago,<sup>41</sup> todos eles adenocarcinomas. Estudos como o nosso, investigando esta influência em CEC humano, ainda são escassos. Liu et al.<sup>33</sup> mostraram que a catecolamina  $\beta$ -adrenérgica epinefrina estimulou a proliferação celular de linhagens de CEC de esôfago. Esse efeito foi dependente dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e ocorreu via ativação de ERK (sinais extracelulares regulados por Kinase) e COX-2 (Ciclooxigenase-2). As vias de sinalização intracelular que são ativadas nas células SCC9 e SCC25, após serem estimuladas com os hormônios relacionados ao estresse, serão um dos alvos de nossos próximos estudos.

Os resultados deste trabalho mostraram que células de CEC de boca SCC9 expressam ambos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ . Este parece ser o segundo estudo a mostrar a presença de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e os efeitos proliferativos de agonistas adrenérgicos em linhagens celulares de câncer de boca. Recentemente, Shang et al.<sup>32</sup> avaliaram a expressão do receptor adrenérgico  $\beta_2$  na linhagem celular de CEC de boca TCa8113. Semelhante ao que foi observado neste estudo com as linhagens SCC9 e SCC25, a linhagem TCa8113 expressou receptor  $\beta_2$  e apresentou aumento de proliferação quando tratadas com NE. Esse efeito também foi inibido pelo propranolol. Os resultados obtidos por Shang et al.<sup>32</sup> e pelo presente estudo fornecem fortes indícios de que catecolaminas, como a NE, podem ter importante papel na progressão do câncer de boca. Outro ponto importante na relação entre as catecolaminas, como a NE e o câncer, e que não foi alvo de investigações, é em relação aos níveis que essa catecolamina pode atingir no microambiente tumoral. Dados de pesquisas em carcinoma de ovário<sup>13</sup> mostram que as concentrações de NE no tecido tumoral em condições de estresse podem ser muito maiores que as concentrações no sangue periférico, denotando ainda mais a possível interferência biológica do estresse psicológico nas neoplasias malignas.

Efeitos do cortisol sobre a expressão de RNAm para IL-6 foram diferentes entre as linhagens SCC9 e SCC25. O hormônio não determinou alterações

## Capítulo 2

---

significativas na expressão de IL-6 pelas células SCC25. Nas células SCC9 esta expressão diferiu de acordo com a dose do hormônio. Após 1 hora, o cortisol em concentração compatível com situações de estresse em humanos (10 nM) aumentou a expressão de IL-6, mas esse resultado não apresentou significância estatística. Já concentrações farmacológicas do hormônio (1000 nM) induziram significativa redução de IL-6 em todos os períodos analisados. Vários estudos têm mostrado que glicocorticoides apresentam um efeito inibitório na expressão de citocinas como a IL-6 e IL-8.<sup>42,43</sup> Entretanto, na maioria dessas investigações, o cortisol foi testado em concentrações farmacológicas (1000 nM ou mais). Lutgendorf et al.<sup>12</sup> também encontraram variações nos efeitos do cortisol, dependendo da concentração testada, na expressão de VEGF em linhagens de carcinoma de ovário. Semelhante aos nossos resultados com a IL-6, o cortisol em doses farmacológicas inibiu a expressão de VEGF, mas aumentou essa expressão em um nível que reflete condições de estresse (10 nM). Por outro lado, os resultados da presente pesquisa mostraram que níveis de 1000 nM estimularam a proliferação das células SCC9 após 6 horas de estímulo. Esse efeito de duas vias do cortisol na expressão de citocinas relacionadas à progressão tumoral como a IL-6, e os efeitos nos mecanismos do ciclo celular precisam ser melhor estudados.

Nós mostramos que as linhagens de CEC bucal SCC9 e SCC25 produzem NO e que os hormônios do estresse são capazes de regular *in vitro* esta produção. Essa regulação dependeu do tipo celular e da concentração do hormônio e parece ser mais influenciada por estímulos do eixo HPA do que estímulos adrenérgicos. Alteração da produção de NO no sobrenadante celular, só foi encontrada em resposta aos estímulos adrenérgicos com doses excessivas de NE e isoproterenol (100 µM). Nessa alta concentração, vimos pelos ensaios de MTT, que a NE induziu inibição do crescimento de células SCC9 indicando possível efeito citotóxico e acúmulo de NO por morte celular e não necessariamente por ativação de receptores β-adrenérgicos. Por outro lado, cortisol a 10 nM estimulou a produção de NO pelas células SCC9 após 6 horas, com as concentrações chegando a 1,4 µM, em comparação às concentrações de 0,9 µM produzidas pelas células não estimuladas com o hormônio e por aquelas que tiveram o receptor de glicocorticóide bloqueado antes do estímulo. Estudos mostram que flutuações nas concentrações de NO podem induzir diferentes efeitos celulares. Por exemplo, concentrações de 75 a 300 µM de NO inibem, *in vitro*, o crescimento de células derivadas do CEC de boca,

## Capítulo 2

---

enquanto concentrações menores induzem diferenciação celular.<sup>30,31</sup> As concentrações de NO usadas nesses estudos são ainda bem maiores que às observadas no presente estudo após os estímulos hormonais. Os efeitos biológicos das alterações dos níveis de NO encontradas após os estímulos com cortisol a 10 nM (para a linhagem SCC9) e cortisol a 1000 nM (para a linhagem SCC25) precisam ser investigados. Conjuntamente, é necessário identificarmos nas células de CEC bucal, quais são os efeitos dos hormônios do estresse sobre as enzimas de conversão do NO (principalmente, NOSe e NOSi), visto que essas enzimas têm sido associadas aos mecanismos de invasão e metástase regional no CEC de cabeça e pescoço.<sup>44,45</sup>

No presente estudo, a ação da NE sobre as linhagens de CEC bucal SCC9 e SCC25 se mostrou dependente de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Além de confirmarmos que as linhagens SCC9 e SCC25 expressam receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , nós também mostramos que eles estão presentes em amostras de CEC de boca, leucoplasia bucal e amostras de mucosa normal. Todas as amostras de CEC de boca expressaram receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , mas os perfis de expressão em relação às amostras de leucoplasia e mucosa normal diferiram de acordo com o tipo de receptor. Enquanto, para o receptor  $\beta_2$  houve, quantitativamente, apenas leve diminuição de sua expressão nas amostras de leucoplasia em relação ao CEC e mucosa normal, para o receptor  $\beta_1$  as diferenças foram evidentes. Quantitativamente, a média relativa da expressão do receptor  $\beta_1$  no CEC de boca foi quase duas vezes maior que nas amostras de leucoplasia, e quase três vezes superior em relação à mucosa normal. Isto pode indicar que moléculas adrenérgicas agonistas de  $\beta_1$ , como a NE, podem determinar efeitos estimulatórios mais pronunciados no tumor do que em tecidos não neoplásicos. A expressão do receptor  $\beta_2$  em amostras de CEC de boca foi avaliada por Shang et al.<sup>32</sup> Análise imunohistoquímica revelou que 67,7% dos tumores foram positivos para o receptor  $\beta_2$ , enquanto apenas 20% das amostras de mucosa normal apresentaram positividade. A expressão positiva para o receptor adrenérgico  $\beta_2$  foi significativamente correlacionada com metástase regional, idade, tamanho do tumor e estágio clínico. Contudo, a expressão do receptor  $\beta_1$  não foi avaliada pelos pesquisadores. Em nossa casuística, somente uma amostra de mucosa normal foi negativa para  $\beta_2$  e quantitativamente não houve diferença evidente entre a expressão do receptor em amostras tumorais e na mucosa normal. A explicação

## Capítulo 2

---

para a discrepância desses resultados provavelmente está na diferença de metodologia empregada para cada estudo. Enquanto Shang et al.<sup>32</sup> avaliaram a imunomarcção epitelial do receptor por imunohistoquímica, nós analisamos fragmentos teciduais por PCR em tempo real, de modo que outros tipos celulares do microambiente tecidual, que podem expressar receptores  $\beta$ -adrenérgicos, também foram incluídos na análise. Apesar disso, é cada vez mais evidente que o CEC não é uma doença restrita ao epitélio, sofrendo um conjunto grande de influências moleculares do microambiente. Por essa visão, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes nas células estromais podem ser via importante na interação epitélio-mesênquima e contribuir para as alterações epiteliais.

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos são membros da grande família de receptores acoplados à proteína-G e sua ativação envolve as vias da proteína tirosina kinase (PTK), como também a ativação das vias relacionadas ao monofostato de adenosina cíclico (AMPC). A expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos tem sido mostrada em vários tipos de câncer onde podem mediar a proliferação, migração e induzir metástases.<sup>2,41,46-48</sup> A análise da expressão do receptor adrenérgico  $\beta_1$  em amostras de CEC de boca e leucoplasia bucal ainda não havia sido relatada. Uma das hipóteses para neste estudo a expressão do receptor  $\beta_1$  ter sido mais marcante nas amostras de leucoplasia e CEC, pode ser o efeito tecidual provocado pelos produtos do cigarro no tecido tumoral e leucoplásico em relação à mucosa normal, cuja grande maioria das amostras (93,4%) era de não fumantes. Estudos prévios revelaram que produtos derivados da nicotina aumentam a expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e por meio deles induzem crescimento tumoral.<sup>41,46,47</sup> Entretanto, os possíveis efeitos da nicotina não explicam os dados que tivemos com o receptor  $\beta_2$ , indicando que outros mediadores ou vias possam modular juntamente com os produtos do cigarro a expressão desses receptores no CEC de boca.

Estudos epidemiológicos experimentais com animais têm mostrado que o estresse psicológico pode promover crescimento tumoral.<sup>1,2,5</sup> Entretanto, o significado biológico do estresse e seus mecanismos patogênicos no câncer humano ainda são alvos de polêmica. Cortisol e NE encontram-se elevados em indivíduos com estresse agudo e crônico, mas seus efeitos no crescimento tumoral ainda são pobremente compreendidos. No presente estudo, os resultados revelaram que os hormônios do estresse regulam diretamente a expressão de IL-6, podem modular a produção de NO e induzem proliferação de células de CEC bucal por meio de  $\beta$ -

## Capítulo 2

---

receptores. Isso indica a possibilidade desses hormônios agirem, por exemplo, como um co-fator ao tabagismo, fator de risco para o câncer bucal. Essa possível relação, como também os mecanismos sistêmicos e locais dos hormônios do SNS e eixo HPA no paciente com câncer de cabeça e pescoço, precisam ser compreendidos em maior abrangência. De todo modo, este estudo traz uma das primeiras evidências de que fatores neurohormonais relacionados ao estresse podem influenciar o comportamento biológico do CEC de boca, uma das neoplasias malignas cujos altos índices de mortalidade continua sendo um desafio.

### **Agradecimentos**

Agradecemos o Professor Ricardo Della Coletta (FOP-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil) por gentilmente ceder as linhagens de CEC de boca utilizadas neste estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2006/59835-0).



### 3.7 Referências

1. Reiche, EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004; **5**(10):617–625.
2. Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle* 2007;**6**(4):430-433.
3. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005;**5**(3):243-251.
4. Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H, Koskenvuo M. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2003; **157**(5):415-423.
5. Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**(3):240-248.
6. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;**24**(8):444-448.
7. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychoneuroimmunology and cancer: fact or fiction? *Eur J Cancer* 1999;**35**(11):1603-1607.
8. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychoneuroimmunology and immunotoxicology: implications for carcinogenesis. *Psychosom Med* 1999;**61**(3):271-272.
9. Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. *Psychosom Med* 1996;**58**(3):264-272.
10. Ardestani SK, Inserra P, Solkoff D, Watson RR. The role of cytokines and chemokines on tumor progression: a review. *Cancer Detect Prev* 1999;**23**(3):215-225.
11. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;**4**(4):221-233.
12. Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, et al. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2003;**9**(12):4514-4521.
13. Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, et al. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;**12**(2):369-375.

14. Saul AN, Oberyszyn TM, Daugherty C, et al. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**(23):1760-1767.
15. Ben-Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC, Taylor AN, Gale RP. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav Immun* 1991;**5**(2):193-205.
16. Melamed R, Rosenne E, Shakhar K, Schwartz Y, Abudarham N, Ben-Eliyahu S. Marginating pulmonary-NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a beta-adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor. *Brain Behav Immun* 2005;**19**(2):114-126.
17. Lointier P, Wildrick DM, Boman BM. The effects of steroid hormones on a human colon cancer cell line in vitro. *Anticancer Res* 1992;**12**(4):1327-1330.
18. Heikkilä K, Ebrahim S, Lawlor DA. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer* 2008;**44**(7):937-945.
19. Chakravarti N, Myers JN, Aggarwal BB. Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane). *Int J Cancer* 2006;**119**(6):1268-1275.
20. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2005;**29**(1):42-45.
21. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 2008;**113**(4):750-757.
22. Okamoto M, Hiura K, Ohe G, et al. Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. *Cancer* 2000;**89**(9):1966-1975.
23. Nagata M, Fujita H, Ida H, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;**106**(5):683-689.
24. De Schutter H, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S. The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. *BMC Cancer* 2005;**5**:42.

25. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(15):9090-9095.
26. Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, et al. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun* 2009;**23**(2):267-275.
27. Nilsson MB, Armaiz-Pena G, Takahashi R, et al. Stress hormones regulate interleukin-6 expression by human ovarian carcinoma cells through a Src-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2007;**282**(41):29919-29926.
28. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;**19**(5):711-721.
29. Connelly ST, Macabeo-Ong M, Dekker N, Jordan RC, Schmidt BL. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;**41**(3):261-267.
30. Zhao SF, Tong XY, Zhu FD. Nitric oxide induces oral squamous cell carcinoma cells apoptosis with p53 accumulation. *Oral Oncol* 2005;**41**(8):785-790.
31. Lee SK, Kim HS, Lee HJ, et al. Dual effect of nitric oxide in immortalized and malignant human oral keratinocytes: induction of apoptosis and differentiation. *J Oral Pathol Med* 2006;**35**(6):352-360.
32. Shang ZJ, Liu K, Liang DF. Expression of beta(2)-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;**38**(4):371-376.
33. Liu X, Wu WK, Yu L, et al. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta-adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem* 2008;**105**(1):53-60.
34. Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* 2002;**51**(6 Suppl 1):5-10.
35. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;**274**(2):177-188.

36. Briest W, Rassler B, Deten A, et al. Norepinephrine-induced interleukin-6 increase in rat hearts: differential signal transduction in myocytes and non-myocytes. *Pflugers Arch* 2003;**446**(4):437-446.
37. Chan C, Lin HJ, Lin J. Stress-associated hormone, norepinephrine, increases proliferation and IL-6 levels of human pancreatic duct epithelial cells and can be inhibited by the dietary agent, sulforaphane. *Int J Oncol* 2008;**33**(2):415-419.
38. Schuller HM, Tithof PK, Williams M, Plummer H 3rd. The tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is a beta-adrenergic agonist and stimulates DNA synthesis in lung adenocarcinoma via beta-adrenergic receptor-mediated release of arachidonic acid. *Cancer Res* 1999;**59**(18):4510–4515.
39. Askari MD, Tsao MS, Schuller HM. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;**131**(10):639–648.
40. Cakir Y, Plummer HK 3 rd, Tithof FPK, Schuller HM. Beta-adrenergic and arachidonic acid-mediated growth regulation of human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 2002;**21**(1):153–157.
41. Shin VY, Wu WK, Chu KM, et al. Functional role of beta-adrenergic receptors in the mitogenic action of nicotine on gastric cancer cells. *Toxicol Sci* 2007;**96**(1):21–29.
42. Hasan Q, Tan ST, Xu B, Davis PF. Effects of five commonly used glucocorticoids on haemangioma in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;**30**(3):140-144.
43. Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y, Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;**12**(10):3003-3009.
44. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;**90**(8):587-596.
45. Brennan PA, Dennis S, Poller D, Quintero M, Puxeddu R, Thomas GJ. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and

## Capítulo 2

---

- enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008;**30**(2):208-214.
46. Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH. Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol Sci* 2007;**97**(2):279-287.
47. Laag E, Majidi M, Cekanova M, Masi T, Takahashi T, Schuller HM. NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells. *Int J Cancer* 2006;**119**(7):1547-1552.
48. Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res* 2006;**66**(21):10357-10364.

**ANEXO A – Características clínicas dos pacientes e voluntários portadores de CEC de boca, leucoplasia e mucosa normal, cujas amostras foram submetidas à análise de expressão dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos por PCR em tempo real.**

Variáveis	Indivíduos com mucosa normal n=15	Pacientes com leucoplasia n=17	Pacientes com CEC de boca n=20
<b>Média Idade (anos)</b> (variação)	59 (40 – 79)	58,76 (42-82)	60,95 (43-80)
<b>Sexo: n (%)</b>			
Masculino: n (%)	5 (33,3)	7 (41,2)	15 (75,0)
Feminino: n (%)	10 (66,7)	10 (58,8)	5 (25,0)
<b>Localização da lesão primária: n (%)</b>			
Assoalho	1 (6,7)	2 (11,8)	4 (20)
Gengiva	1 (6,7)	1 (5,9)	0
Língua	1 (6,7)	1 (5,9)	3 (15)
Mucosa jugal	6 (40)	6 (35,4)	2 (10)
Palato	0	3 (17,4)	3 (15)
Rebordo	5 (33,2)	2 (11,8)	4 (20)
Retromolar	1 (6,7)	2 (11,8)	4 (20)
<b>Vício de fumar n (%)</b>			
Não	14 (93,4)	1 (5,9)	3 (15)
Sim	1 (6,6)	16 (94,1)	17 (85)
<b>Vício de beber n (%)</b>			
Não	14 (93,4)	11 (64,7)	5 (25)
Sim	1 (6,6)	6 (35,3)	15 (75)
<b>Estádio Clínico n (%)</b>			
I			2 (10)
II	-	-	4 (20)
III			4 (20)
IV			10 (50)

CEC = Carcinoma Espinocelular; PCR = Reação da cadeia de polimerase.

## ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

**unesp** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
Campus de Aracatuba

OF. 010/2008  
CEP  
SFCB/bri

Aracatuba, 10 de março de 2008.

Referência Processo POA 2006-01458

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, em reunião de 22/11/07 deliberou, após o Parecer favorável da relatora Prof. Dr. Silvia Helena Venturoli Perri, às fls. 102, aprovar e conceder a alteração do título do projeto proposto "Influência do tabagismo e alcoolismo e da concentração plasmática de cortisol na expressão de IL-6 quimiocinas e óxido nítrico em pacientes com carcinoma de boca. Estudo in-vivo e in-vitro" para "Avaliação da influência neurohormonal sobre o carcinoma espinocelular de boca".

  
Prof. Dr. Stefan Viçza de Carvalho Dekon  
Coordenador do CEP

Emo: Senhor  
**Dr. Daniel Galera Bernabé**  
Campus de Aracatuba

Ciente de acordo  
  
Dr. Daniel Galera Bernabé

Para mais de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária - DIRETORIA - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Rua José Bonifácio, 110 CEP: 16015-050 - Aracatuba - SP  
Tel: (16) 330-3222 E-mail: cetera@fca.unesp.br

## ANEXO C – Normas de Publicação do Periódico Head & Neck

### Head & Neck

#### For Authors

#### NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley InterScience journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

- [Copyright Transfer Agreement](#)
- [Permission Request Form](#)
- [Online Manuscript Submission](#)
- [Wiley's Journal Styles and EndNote](#)
- [Authorship Disclosure Form](#)
- [The National Institutes of Health Public Access Initiative](#)

#### Instructions To Authors

##### **Manuscript Submission**

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/hed> .

Ehab Y. Hanna, MD

The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center

Head and Neck Surgery

1515 Holcombe Blvd, Unit 1445

Houston, TX 77030

E-mail: [eyhanna@mdanderson.org](mailto:eyhanna@mdanderson.org)

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/hed> . Check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, create a new account. Follow all instructions.

Submit manuscript and all figures as one file if possible. You do not need to mail any paper copies of your manuscript.

Along with the manuscript file, please upload a Cover Letter (designated "not for review") which includes the contact information of the corresponding author, a statement of financial or other relationships which may lead to a conflict of interest, and which references any published reports that may duplicate material in the submitted manuscript. Signed releases from patient(s) or guardian(s) for use of any recognizable patient photographs may be faxed separately, or scanned and uploaded as part of the online submission.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at [edsupport@wiley.com](mailto:edsupport@wiley.com) .

**Copyright.** No article can be published unless accompanied by a signed copyright transfer agreement, which serves as a transfer of copyright from author to publisher. A copyright transfer agreement may be obtained from the editor or the publisher. A copy of the agreement appears in most issues of the journal. Only original papers will be accepted and copyright in published papers will be vested in the publisher. It is



the author's responsibility to obtain written permission to reproduce material that has appeared in another publication.

**Style**

**Sources.** *Webster's Third New International Dictionary* (Springfield, MA: Merriam-Webster, Inc) should be used for spelling and hyphenation of nonmedical terms, and *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, 27th ed (Philadelphia: WB Saunders) for medical terms. The author is directed to the American Medical Association *Manual of Style*, 8th ed, for general style. Measure (length, height, weight, and volume) should be reported in units or their decimal multiples. Temperature should be given in degrees Celsius, and blood pressure should be given in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in SI (international system) units.

**Numbers.** Use numerals for all units of measure and time. Spell out the numbers one through nine only for general usage (eg, "We considered only two possibilities.") Spell out numbers beginning a sentence.

**Abbreviations.** Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first mention in the text. Only standard abbreviations as listed in the *AMA Manual of Style* should be used without definition.

**Manuscript Preparation**

**Title Page.** The title page should include (1) a concise and informative title of the article using terms that can be readily indexed; (2) the authors' full names (first name, middle initial, surname) with highest earned degrees; (3) affiliations for each author (department, section, institution, city and state or country where the work was done); (4) acknowledgment of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study; (5) identification of meetings at which the manuscript was presented, if appropriate; (6) the name, address, telephone number, and email address of the author to whom correspondence and/or reprint requests are to be sent; (7) a brief running title; and (8) five key words for indexing.

**Authorship.** All persons designated as authors should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content of the manuscript. Authorship credit should be based on substantial contributions to (1) conception and design or analysis and interpretation of data, (2) drafting of the manuscript or revising it for important intellectual content and, (3) final approval of the version to be published. The Editor may require the authors to justify assignment of authorship. In the case of collective authorship, the key persons responsible for the article should be identified and others contributing to the work should be recognized with proper acknowledgment.

**Abstract.** Page 2 should include a structured abstract of no more than 150 words, divided into the following subheadings: Background, Methods, Results, and Conclusions.

**Text.** Manuscripts should be organized in the following format: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Other descriptive headings and subheadings may be used if appropriate. The content of the study should be presented as clearly and concisely as possible. In the methods section, the selection process for observational and experimental subjects should be defined clearly. Identify methods, apparatus (manufacturer's name and address), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. References should be given for discussions of previous studies and for all nonstandard methods used. When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed

were in accordance with the ethical standards of the committee on human experimentation of the institution or in accord with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 1983. For experiments on animals, indicate whether the institution's or the National Research Council's guide for the care and use of laboratory animals was followed. For drugs and chemicals, the generic name should be used at first mention and preferably thereafter. Trade names may appear in parentheses and should be capitalized. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in figures or tables. Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Reference the statistical methodology employed. Specify any general-use computer programs used.

Present your results in logical sequence in text, tables, and figures. Avoid duplication of data in the text and tables, figures, or both. Emphasize or summarize only important observations. In a discussion, emphasize new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Avoid repetition and present recommendations. If case reports are necessary to illustrate a point, they should contain only the pertinent information.

All tables and figures should be numbered consecutively at first mention in the text. All data cited in the text should be checked carefully against data in the tables to be sure they correspond. All names cited in the text should be checked carefully against the references to ensure the spelling is correct.

#### **References.**

##### **Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote**

EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style.

**Download Reference Style for this Journal:** If you already use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

**How to Order:** To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, [click here](#)

**Technical Support:** If you need assistance using EndNote, contact [endnote@isiresearchsoft.com](mailto:endnote@isiresearchsoft.com), or visit [www.endnote.com/support](http://www.endnote.com/support).

All references should be cited in consecutive numerical order at first mention in the text. Type references double-spaced and list them consecutively not alphabetically. Identify references in the text, tables, and legends by Arabic numerals typed as superscripts. References cited only in a table or in a figure legend should be numbered in accordance with a sequence established by the first mention in the text of the particular table or figure. *Head & Neck* follows the Uniform Requirements for reference style:

**Journal article** (list all authors when six or less; when seven or more, list only first three and et al.)

King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

#### **Book**

Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

#### **Book chapter**

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. Receptor localization. New York: Wiley-Liss; 1998. p 75-90.

Journal names should be abbreviated in *Index Medicus* style. Unprivileged observations and personal communications should not be used as references, although written nonverbal communications may be noted as such in the text. References cited as "in press" must have been accepted and not merely in preparation or submitted. Unpublished observations and personal communications must not appear in the references, but may be cited in parentheses in the text. The author is responsible for the accuracy and completeness of references.

**Tables.** Do not submit tables as photographs. Wide tables are difficult to typeset and should be avoided by restructuring or breaking them into smaller tables. Each table must have a title, and every column in the table including the left-hand column should have a concise heading. Define all abbreviations in a footnote to the table and indicate the units of measurement for all values. Use commas for all numbers exceeding 999 and use zeroes before decimals for numbers less than one. Organize the tables so that like data are read vertically, not horizontally.

Do not use internal horizontal or vertical lines to separate sections. Explain all empty spaces or dashes; indicate footnotes to the table using symbols in the order shown: \* (asterisk), † (dagger), ‡ (double dagger), § (section mark), ¶ (parallels), ¶ (paragraph mark), # (number sign). Care should be taken to limit the number of footnotes to seven or less. If data from any other source, published, or unpublished, are used, the author must obtain written permission for their use and cite the source in the footnotes.

**Figures.** Figures should be large enough to remain legible when reduced for publication. Be sure all spelling is correct, letters and lines are unbroken and type is even, and the abbreviations used are consistent with those in the text. For photographs of identifiable persons, written permission from the subject must be supplied or the subject's eyes will be masked.

All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible. The cost of printing figures in color is as follows: \$950 for the first page; \$450 for pages 2 through 4; \$950 page 5 and after.

**Figure legends.** Legends should be typed double-spaced and labeled with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, numbers, or letters are used to identify areas of the figure, each should be clearly explained in the legend. For photomicrographs, the method of staining and original magnification must be given. If the figure has been previously published, a credit line should be included and permission to reprint from the publisher supplied.

### **Review Process**

All manuscripts are reviewed by the Editor and at least two expert reviewers in the field. The decision of the Editor is final and may require more than one revision of the manuscript. All material accepted for publication is subject to copy editing. The corresponding author will receive page proofs of articles before publication and should answer all queries and carefully check all editorial changes at this stage.

Authors are responsible for the scientific content of the article. Forms for purchasing reprints accompany page proofs.

### **Manuscript Checklist**

- Original double-spaced typed manuscript and two copies.
- 
- Copyright transfer.
- Title page with title, authors' names, degrees, and complete affiliations; corresponding author, complete address, and telephone and email address; author for reprint requests and complete address; and acknowledgments.
- Structured abstract (maximum, 150 words).
- References in consecutive numerical order; typed double-spaced.
- Figures and Tables in consecutive numerical order.
- Legends for all Figures, typed double-spaced.
- Consent forms for patient photographs.
- Written permission from the publisher to reprint previously published Figures and Tables.

**Medical Disclaimer.** All articles published, including but not limited to original research, clinical notes, editorials, reviews, reports, letters, and book reviews, represent the opinions and views of the author and do not reflect any official policy or medical opinion of the New York Head and Neck Society or the institutions with which the authors are affiliated or of the Publisher unless this is clearly specified. Articles published herein are intended to further general scientific research, understanding, and discussion only and are not intended and should not be relied upon as recommending or promoting a specific method, diagnosis, or treatment by physicians for any particular patient.

While the Editor and Publisher believe that drug selections and dosages and the specifications and usage of equipment and devices as set forth herein are in accord with current recommendations and practice at the time of publication, they accept no legal responsibility for any errors or omissions, and make no warranty, express or implied, with respect to material contained within.

Publication of an advertisement or other discussions of products in the Journal should not be construed as an endorsement of the products or the manufacturers' claims. Readers are encouraged to contact the manufacturers with any questions about the features or limitations of the products mentioned.

**Disclosure Statement.** All authors must disclose any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author's knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter or materials discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, a seat on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. This requirement will apply to every sort of article submitted to the Journal, including original research, reviews, editorials, letters to the editor, and any others, and should be disclosed at the time of submission. The simplest remedy for conflict of interest is disclosure. In the Journal, disclosure will henceforth be achieved by the inclusion of a short footnote with each published article. This information will be held in confidence while

## Anexos

---

the paper is under review. It will not be shared with peer reviewers, and it will not influence the editorial decision to accept or reject the manuscript. When an article is accepted for publication, the editors will usually discuss with the authors the manner in which such information is to be presented.

## **ANEXO D – Normas de Publicação do Periódico Oral Oncology**

### **Oral Oncology**

A Journal Related to Head & Neck Oncology & Pathology

Guide for Authors

#### **Submission checklist**

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review.

#### **Ensure that the following items are present:**

• One Author designated as corresponding Author:

E-mail address

Full postal address

Telephone(s) and fax numbers

- All necessary files have been uploaded
- Keywords (as comprehensive as possible)
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- The Author Form has been completed and uploaded to EES (or sent to the Editorial Office via fax)

#### **Further considerations:**

- Manuscript has been "spellchecked" and is written in good English
- Title is clear and unambiguous
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- The manuscript conforms to the limits imposed on original research and review articles (2500 words for original research articles and 3000 words for review articles with a maximum of five tables and figures)

For any further information please contact the Author Support Department at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)

#### **Prior to Submission**

*Oral Oncology* will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from [www.icmje.org](http://www.icmje.org)). Authors are advised to read these guidelines.

#### **Previous Publication**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be

published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

### **Online-only Publication**

Due to the large number of high-quality papers submitted to *Oral Oncology* the time taken for accepted articles to be published in print has risen significantly. There may be a delay of many months before an accepted paper is selected for publication in a printed issue. *Oral Oncology* offers authors the opportunity to select online-only publication as their preferred option for publishing original research and review papers in the journal, rather than print publication. Letters to the Editor which are accepted for publication and errata and corrigenda will be published online-only and will not appear in print.

Any material which is published online-only will be published online on ScienceDirect as paginated and fully citable electronic article. It will be listed in the contents page of a printed issue and the full citation and abstract will be published in print. The citation and abstract of the paper will also still appear in the usual abstracting and indexing databases, including PubMed/Medline, Current Contents/Clinical Medicine and the Science Citation Index.

Authors will be asked to select which publication option they would prefer when submitting their paper to the Editorial Office.

### **Randomised Controlled Trials**

All randomised controlled trials submitted for publication in *Oral Oncology* should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. *Oral Oncology* has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

### **Ethics**

Work on human beings that is submitted to *Oral Oncology* should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

### **Patient Consent Guidelines**

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent which should be documented in your paper.

Patients have a right to privacy. Therefore, identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to Elsevier on request.

Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and Editors should so note.

If such consent has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

#### ***Conflict of Interest***

At the end of text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, please state "None declared".

#### ***Role of the Funding Source***

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

#### ***Authorship and Acknowledgments***

All authors must be accredited on the paper and all must submit a completed Author Form with their submission. The form must be signed by all authors and can be scanned and uploaded to EES or returned to the Editorial Office via fax (+44 (0) 1865 843992). No subsequent change in authorship will be possible.

#### ***Copyright***

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

#### ***Authors' Rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### ***Manuscript Submission***

Submission to *Oral Oncology* proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF



at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

### **General Points**

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://authors.elsevier.com>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

### **Word Limits**

Original research articles submitted to the journal must be 2500 words in length or less, with a maximum of five figures and tables. Review articles submitted to the journal must be 3000 words or less in length, with a maximum of five tables or figures.

### **Presentation of Manuscript**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

### **Language Polishing**

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions: [http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions)

### **Provide the following data on the title page:**

**Title:** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations:** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the

appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

**Corresponding Author:** Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

**Present/permanent address:** If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Suggestions for reviewers:** Please supply the names of up to three potential reviewers for your manuscript. Please do not suggest reviewers from your own institution, previous or current collaborators. Please provide full names, addresses and email addresses of suggested reviewers. Please note: the final choice of reviewers is that of the Editor and the journal reserves the right not to use reviewers which have been accepted by the authors.

**Abstract:** A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. A structured abstract is required. For this, a recent copy of the journal should be consulted. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

**Keywords:** Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as *Oral Cancer*, or *Head and Neck cancer*

**Abbreviations:** Define abbreviations or acronyms that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Text:** This should start on the third page and should be subdivided into the following sections: Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, and Discussion.

**References:** Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. "Unpublished data" and "Personal communications" are not allowed. As an alternative, say in the text, for example, '(data not shown)' or '(Dr F.G. Tomlin, Karolinska Institute)'. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference numbers must always be given. Number the references in the reference list in the order in which they appear in the text.

**Examples:**

1. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;**37**(5):401-418.
2. Gullick WJ, Venter DJ. The c-erbB2 and its expression in human tumors. In: Waxman J, Sikora K, editors. *The molecular biology of cancer*. Oxford: Blackwell Scientific, 1989. p. 38-53.

3. Scully C, Cawson RA. Medical Problems in Dentistry. 5th edition Oxford: Butterworth-Heinemann. 2004

For more than 6 authors that first 6 should be listed followed by "et al". For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997; 277 : 927-934) (see also [http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)).

### **Figure Captions, Tables, Figures and Schemes**

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

#### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### **Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **Nomenclature and Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

#### **Preparation of Electronic Illustrations**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### **Formats**

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

**Please do not:**

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to colour reproduction in print.

**Captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Line drawings**

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations.

Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

**Photographs (halftones)**

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Note that photocopies of photographs are not acceptable.

**Preparation of supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

**Special Subject Repositories**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

**Proofs**

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

**Author Enquiries**

Visit the Author Gateway from Elsevier <http://authors.elsevier.com> for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you when an article's status changes. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, and answers to frequently asked questions