

Tálita Pollyanna Moreira dos Santos

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Agosto/ 2015

Tálita Pollyanna Moreira dos Santos

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva
Departamento de Clínica, Patologia e
Cirurgia Odontológicas da Faculdade de
Odontologia da UFMG

Belo Horizonte

Agosto/ 2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe Sandra Santos (*in memoriam*), que é a maior tradução de amor para mim.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é a única palavra que poderia resumir o meu sentimento neste importante momento da minha trajetória profissional. Desta forma, agradeço ao meu pai Pedro Santos pelo amor, apoio e estrutura para que eu alcançasse meu sonho. Agradeço ao meu irmão Dr. Bruno Gomes por sonhar e vibrar junto comigo, por me apoiar e por dividirmos tantas gargalhadas.

Aos meus tios e primos por torcerem e vibrarem por mim;

Aos meus amigos por acreditarem na minha capacidade;

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Tarcília Silva por ter me concedido a oportunidade de trabalhar no seu laboratório e por ter me ensinado tanto. Por ser um exemplo de pesquisadora e profissional, sempre tão competente e dedicada. Obrigada também por ter tido a sensibilidade de perceber minhas falhas de maneira tão atenciosa e bem humorada e esperar o meu tempo para corrigi-las. Por sempre me atender com um enorme sorriso no rosto. Obrigada por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma tinha certeza e por depositar tanta confiança em mim. Confiança tal que me permitiu ir à USP Ribeirão Preto fazer experimentos, o que foi a realização de um sonho. Esta oportunidade me proporcionou expandir minha rede de relacionamentos profissional e pessoal. Enfim, obrigada por tudo!

Aos meus companheiros de laboratório Soraia Macari, Izabella Lima, Mila Madeira, Carina Montalvany, Davidson Fróis e Joice Correa por todo auxílio acadêmico, pelos conselhos e pela ótima convivência. Em especial à Janine Silva e Adriana Saraiva. Além da excelência em tudo o que faz, a Janine tem uma qualidade ímpar: ela repassa seu conhecimento. Ela me ensinou tudo e um pouco mais. Bem mais! Sempre foi atenciosa e paciente. E como se não bastasse os ensinamentos técnicos ainda me brindou com sua valiosa amizade que ultrapassou as paredes do laboratório e ganhou a vida. E a Adriana...que amiga maravilhosa, que pesquisadora competente, que empolgação e disponibilidade raríssimos!

Aos melhores IC's que um pós-graduando pode ter: Rafaela Pacheco, Luanny Souto, Letícia Duffles, Roberta Magalhães e Arthur Pacheco. Vocês foram essenciais para a execução deste projeto.

Ao Prof. Mauro Teixeira por nos ceder espaço de trabalho no laboratório de Imunofarmacologia e nos permitir participar das valiosas discussões do seu grupo. A todos os alunos dos laboratórios de Imunofarmacologia, LIMHO e Imunobiofotônica que, direta ou indiretamente, me auxiliaram inúmeras vezes. Para não incorrer em injustiça, prefiro não

nominá-los. Entretanto, injustiça maior seria não destacar às queridas amigas Frankcinéia Assis e Ilma Marçal por terem me acolhido tão bem e pelo inestimável apoio técnico Vou levá-las para sempre no meu coração;

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular ICB/UFMG;

Ao colegiado de Pós-graduação em Biologia Celular da UFMG;

Aos professores da Faculdade de Odontologia.

Agradeço ao Domênico Rومانne e Inês Ferreira pela amizade e pelo excelente trabalho técnico.

À Profa. Andréia Leopoldino por me receber e aos seus alunos por facilitarem meu estágio em seu laboratório.

Seria necessário uma nova dissertação para agradecer a todos e não ser injusta, mas saibam que sou grata a todos vocês que estiveram de alguma maneira neste capítulo da minha vida. Sou realmente muito grata!

Às agências financiadoras CAPES, FAPEMIG e CNPq por viabilizarem este trabalho.

Por fim, lamento muito se não citei alguém. Não foi proposital. Sintam-se todos profundamente agradecimentos, pois é assim que me sinto: GRATA!

“E não me perguntem por quem os sinos dobram; eles dobram por ti.”

*Nenhum homem é uma ilha isolada;
Cada homem é uma partícula do continente, uma parte
da terra (...);
E por isso não pergunte por quem os sinos dobram;
Eles dobram por ti.*

John Donne

RESUMO

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) é o mais frequente entre os cânceres da cavidade oral. O CCEB apresenta alta taxa de invasividade local e para linfonodos regionais, que contribui para o pior prognóstico. O mediador lipídico, fator de ativação plaquetária (PAF), apresenta propriedades pró-angiogênicas e oncogênicas e, desta forma, poderia afetar a progressão neoplásica. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do PAF na carcinogênese bucal experimental induzida por 4NQO. Foram utilizados camundongos machos WT (*wild type*) e PAFRKO (deficientes do receptor de PAF) das linhagens C57BL/6 e BALB/c. Os camundongos do grupo tratado receberam o carcinógeno químico 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) diluído na água de beber (50 µg/ml) durante vinte e oito semanas. Após esse período, os camundongos foram eutanasiados e suas línguas coletadas para análise macroscópica, histopatológica, imunohistoquímica, histoquímica e molecular. Coletou-se o soro para análise de citocinas e quimiocinas por ELISA. Foi utilizado um antagonista do receptor de PAF (UK-74,505) para investigar o efeito da inibição de PAF na invasividade celular *in vitro* de linhagens metastática (HN12) e não metastática (HN13) de CCEB. Nossos resultados mostraram incidências similares de CCEB nas línguas dos animais WT C57BL/6 e PAFRKO. Este padrão se manteve quando analisamos displasia epitelial e imunoexpressão de PCNA. Os camundongos WT e PAFRKO da linhagem BALB/c tratados com 4NQO não apresentaram incidência de lesões macroscópicas e semelhanças na imunoexpressão de PCNA. No entanto, os camundongos WT BALB/c tratados apresentaram maior grau de displasia epitelial em relação aos PAFRKO do mesmo grupo. A análise histoquímica demonstrou que o tratamento com 4NQO aumentou o infiltrado de eosinófilos na língua dos camundongos WT de ambas as linhagens. Com relação aos camundongos transgênicos, o carcinógeno reduziu o infiltrado de eosinófilos nos camundongos BALB/c PAFRKO. A concentração de CCL4 e CCL5 foi significativamente aumentada após o tratamento com 4NQO nos camundongos WT C57BL/6 e permaneceu inalterada nos camundongos WT BALB/c. Com relação aos camundongos PAFRKO, o tratamento com 4NQO reduziu os níveis sistêmicos de CCL4 e CCL5 nos camundongos da linhagem C57BL/6 mas manteve os níveis inalterados nos camundongos da linhagem BALB/c. O tratamento com 4NQO aumentou os níveis moleculares de citocinas, mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular nos camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6. O uso do antagonista do receptor de PAF inibiu a

invasão celular *in vitro* das linhagens de CCEB HN12 e HN13, porém de maneira significativa somente na linhagem metastática (HN12). Em conclusão, Há um aumento da produção do precursor de PAF (lyso-PAF) durante a carcinogênese bucal induzida em camundongos; o antagonismo farmacológico do receptor de PAF resulta em inibição da invasão celular de CCEB; a ausência de sinalização de PAF em camundongos transgênicos C57BL/6 não altera a progressão da carcinogênese, porém camundongos PAFRKO da linhagem BALB/c apresentam menor escore histológico de displasia epitelial; a progressão tumoral é diferente para as os camundognos WT das linhagens WT BALB/c e C57BL/6, sendo os camundongos BALB/c mais resistentes à indução de lesões de língua.

ABSTRACT

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the cancer most common of the oral cavity. The OSCC has a high rate of local invasiveness and to regional lymph nodes, which contributes to poor prognosis. The lipid mediator platelet activating factor (PAF) has angiogenic and oncogenic properties and thus could affect tumor invasiveness. The aim of this study was to evaluate the role of PAF in experimental oral carcinogenesis induced by 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide). Male WT (wild type) and PAFRKO (PAF receptor deficient) mice of C57BL/6 and BALB / c strains were used. Treated group mice received chemical carcinogen (4NQO) diluted in drinking water (50 µg/ ml) during 28 weeks. After this period, the mice were euthanized and their tongues collected for macroscopic, histopathological, immunohistochemical, inflammatory infiltrate and molecular analysis. Serum was collected for analysis of systemic cytokines and chemokines by ELISA. PAF receptor antagonist (UK-74,505) was used to investigate the effect of inhibiting PAF activity in cell invasiveness of metastatic (HN12) and non-metastatic (HN13) OSCC cell lines *in vitro*. OSCC tongue lesions incidence was similar between treated WT C57BL/6 and PAFRKO mice. The same is pattern was observed when evaluate epithelial dysplasia and PCNA immunostaining. BALB/c WT and PAFRKO mice treated 4NQO showed no incidence of tongue lesions and similar PCNA immunostaining. However, epithelial dysplasia was higher in WT BALB/c treated mice when compared to PAFRKO from the same group. The histochemical analysis showed 4NQO increase eosinophil infiltrate in WT treated mice of both strains. Regarding transgenic mice, carcinogen treatment reduced eosinophils infiltrate in PAFRKO BALB/c mice. Systemic level of CCL4 and CCL5 was significantly increased after treatment with 4NQO in WT C57BL/6 mice when compared to WT control ones, but remained unchanged in WT BALB/c treated mice. Regarding PAFRKO mice, treatment with 4NQO reduced levels of CCL4 and CCL5 in C57BL/6 strain mice but no changes happened in treated PAFRKO BALB/c strain mice. Treatment with 4NQO increased molecular levels of cytokines, inflammatory mediators, growth factors and extracellular matrix components in WT C57BL/6 and PAFRKO mice. Use of PAF receptor antagonist inhibited *in vitro* cell invasion of OSCC lineages HN12 and HN13, but this inhibition was significantly only for metastatic lineage (HN12). In conclusion, PAF precursor (lyso-PAF) production was increased during oral carcinogenesis induced in mice; PAF receptor antagonism results in inhibition of *in vitro* invasion of OSCC lineage; absence of PAF signaling in transgenic

C57BL/6 strain mice does not alter the progression of carcinogenesis, however BALB/c PAFRKO strain mice had lower epithelial dysplasia score; tumor progression is different for WT BALB/c and C57BL/6 strains mice and BALB/c strain mice are more resistant OSCC induced tongue lesions.

LISTA DE ABREVIATURAS

4NQO: *4-Nitroquinoline-1-oxide*

CCEB: Carcinoma de células escamosas de boca

CCL11: *CC chemokine ligant 11*, previamente denominada eotaxin-1

CCL3: *CC chemokine ligant 3*, previamente denominada MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1-alpha*)

CCL5: *CC chemokine ligant 5*, previamente denominada RANTES

CCR1: *CC chemokine receptor 1*

CCR5: *CC chemokine receptor 5*

CEBIO: Centro de Bioterismo

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

Col1a1: Colagenase 1 alpha 1

Col1a2: Colagenase 1 alpha 2

Col4a2: Colagenase 4 alpha 2

Col5a1: Colagenase 5 alpha 1

DMBA: 7,12-dimetilbenz[a]antracene

DNA: Deoxyribonucleic acid

EGF: *Epidermal growth factor*

ELISA: *Enzyme-linked immunoadsorbent assay*

FGF 1: *Fibroblast growth factor 1*

FGF 2: *Fibroblast growth factor 2*

H&E: Hematoxilina e eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IL-1b: Interleucina 1 *beta*

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

IFN- γ : Interferon gama

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ITGA4: Integrina alpha 4

MMP-1: Metaloproteinase-1

MMP-2: Metaloproteinase-2

MMP-8: Metaloproteinase-8

MMP-9: Metaloproteinase-9

MPO: Enzima mieloperoxidase

NAG: Enzima N-acetil- β -glicosaminidase

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAF: *Platelet Activating Factor* (Fator de Ativação Plaquetária)

PAFR: *Platelet Activating Factor Receptor* (Receptor do Fator de Ativação Plaquetária)

PAFRKO: *Platelet Activating Factor Receptor knockout*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

Timp1: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (Inibidor tecidual de metaloproteinase 1)

Timp3: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3* (Inibidor tecidual de metaloproteinase 3)

TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

VEGFa: *Vascular endothelial growth factor alpha* (gene)

VEGFb: *Vascular endothelial growth factor beta* (gene)

VTN: Vitronectina

WT: *wild type*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões de ocorrência de câncer de cabeça e pescoço.....	20
Figura 2. Esquema da síntese de PAF pela via da remodelação.	23
Figura 3. Diagrama esquemático da via de sinalização celular ativada por PAF.....	24
Figura 4. Esquema do modelo experimental de carcinogênese bucal.	31
Figura 5. Esquema das análises realizadas na língua e soro dos camundongos.....	32
Figura 6. Esquema dos ensaios <i>in vitro</i> com linhagens de CCEB.	33
Figura 7. Representação esquemática da gradação histopatológica de displasia epitelial na língua dos camundongos.	36
Figura 8. Aspecto macroscópico representativo das lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	44
Figura 9. Achados macroscópicos das lesões em língua de camundongos C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	45
Figura 10. Aspecto macroscópico representativo das lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.	46
Figura 11. Escore histopatológico e aspectos microscópicos representativos das lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	48
Figura 12. Escore histopatológico e aspectos microscópicos representativos das lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	50
Figura 13. Expressão imunohistoquímica de células suprabasais PCNA positivas e aspectos representativos das células imunomarcadas presentes nas lesões de língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	51
Figura 14. Expressão imunohistoquímica de células suprabasais PCNA positivas e aspectos representativos das células imunomarcadas presentes nas lesões de língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas..	52
Figura 15. Contagem de eosinófilos em lesões de língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	53
Figura 16. Contagem de eosinófilos em lesões de língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	54

Figura 17. Atividade de mieloperoxidase (MPO) em língua de camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6 tratados e não tratados com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. ..	55
Figura 18. Atividade de mieloperoxidase (MPO) em língua de camundongo WT e PAFRKO da linhagem BALB/c tratados e não tratados com 4NQO (50µg/ml) durante 28 semanas.....	56
Figura 19. Atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) em lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados e não tratados com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	57
Figura 20. Produção de CCL4 no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 e BALB/c submetidos ao tratamento com 4NQO.	58
Figura 21. Produção de CCL5 no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 e BALB/c submetidos ao tratamento com 4NQO.	59
Figura 22. Produção de TNF-α no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 e BALB/c submetidos ao tratamento com 4NQO.	60
Figura 23. Expressão de marcadores relacionados a alterações no estroma e parênquima em lesões epiteliais induzidas pelo 4NQO.	63
Figura 24. Efeito do antagonista de PAF (UK-74,505) na capacidade de invasão da linhagem HN12 induzida por CCL3 <i>in vitro</i>	64
Figura 25. Efeito do antagonista de PAF (UK-74,505) na capacidade de invasão da linhagem HN13 induzida por CCL3 <i>in vitro</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia.....	35
Tabela 2. Classificação histopatológica da displasia epitelial nas lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	47
Tabela 3. Classificação histopatológica da displasia epitelial nas lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.....	49
Tabela 4. Sumário comparativo da progressão tumoral entre as diferentes linhagens de camundongos PAFRKO tratados com 4NQO em relação às suas respectivas linhagens de camundongos WT tratados.	61

SUMÁRIO

REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
METODOLOGIA.....	29
1. Animais	30
Modelo experimental da carcinogênese bucal.....	30
2. Eutanásia e coleta de tecidos.....	34
3. Análise macroscópica.....	34
4. Análise histopatológica	34
5. Análise de proliferação celular.....	36
6. Coloração Histoquímica – Sírius Red	37
7. Ensaio da mieloperoxidase (MPO)	37
8. Ensaio de n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	38
9. ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	39
10. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	39
11. Ensaio <i>in vitro</i>	40
RESULTADOS	42
Aspectos macroscópicos.....	43
Aspectos microscópicos.....	47
Análise de proliferação celular	51
Análise do infiltrado inflamatório	53
Eosinófilos	53
Neutrófilos	55
Macrófagos	57
Análise da produção de citocinas.....	58
CCL4	58

CCL5	59
TNF- α	60
Análise da expressão de marcadores relacionados a modificações no estroma e parênquima nas lesões epiteliais induzidas pelo 4NQO	62
Ensaio <i>in vitro</i> – Invasão celular	64
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXO	95
Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/ UFMG)	95

REFERENCIAL TEÓRICO

Câncer

Câncer é a denominação genérica para a doença multifatorial crônica caracterizada pelo crescimento (aumento de massa) e proliferação (divisão) desordenados de células geneticamente mutadas e com perda da diferenciação celular (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2006). A etimologia da palavra câncer advém do latim (*cancer*) e significa caranguejo, uma analogia ao comportamento de crescimento infiltrativo para os tecidos adjacentes dessa doença que, arquitetonicamente, assemelha-se às patas do referido crustáceo (ALMEIDA *et al.*, 2005). O termo câncer é utilizado como nomenclatura genérica das neoplasias malignas. Denomina-se carcinoma as neoplasias originárias de células epiteliais aberrantes (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2006). As células neoplásicas devem adquirir habilidades que subvertam os mecanismos que controlam o crescimento celular. O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas contribuem para o desenvolvimento de células com capacidade proliferativa anormal que desencadeiam na formação das neoplasias (BEKTAŞ-KAYHAN, 2012; RAJU; IBRAHIM, 2011; RIVERA; VENEGAS, 2014; SAMBANDAM *et al.*, 2013; VAIRAKTARIS *et al.*, 2008).

Câncer de boca

Neoplasias que se desenvolvem no trato aéreo superior são denominadas câncer de cabeça e pescoço (KASKAS *et al.*, 2014; KOONTONGKAEW, 2013) (Figura 1). O câncer na região de cabeça e pescoço representa uma das dez neoplasias mais frequentes em todo o mundo, sendo que cerca de 40% ocorrem na cavidade oral. Das neoplasias que se desenvolvem na cavidade oral, cerca de 90% a 95% são carcinoma de células escamosas (CHEEMA; RAMESH; BALAMURALI, 2012; INCA, 2014; KOONTONGKAEW, 2013; MASSANO *et al.*, 2006; OSMAN; COSTEA; JOHANNESSEN, 2012; PUNYANI; SATHAWANE, 2013; RIVERA; VENEGAS, 2014; SALO *et al.*, 2014; SAMBANDAM *et al.*, 2013).

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) origina-se da proliferação exacerbada de células aberrantes da camada basal do epitélio de revestimento – epitélio escamoso - e apresenta caráter maligno (RIVERA; VENEGAS, 2014). Estima-se que neste ano de 2015, haja uma incidência 576.000 casos de câncer no Brasil. Desses novos casos, cerca de 15.290 será de câncer bucal (INCA, 2014).

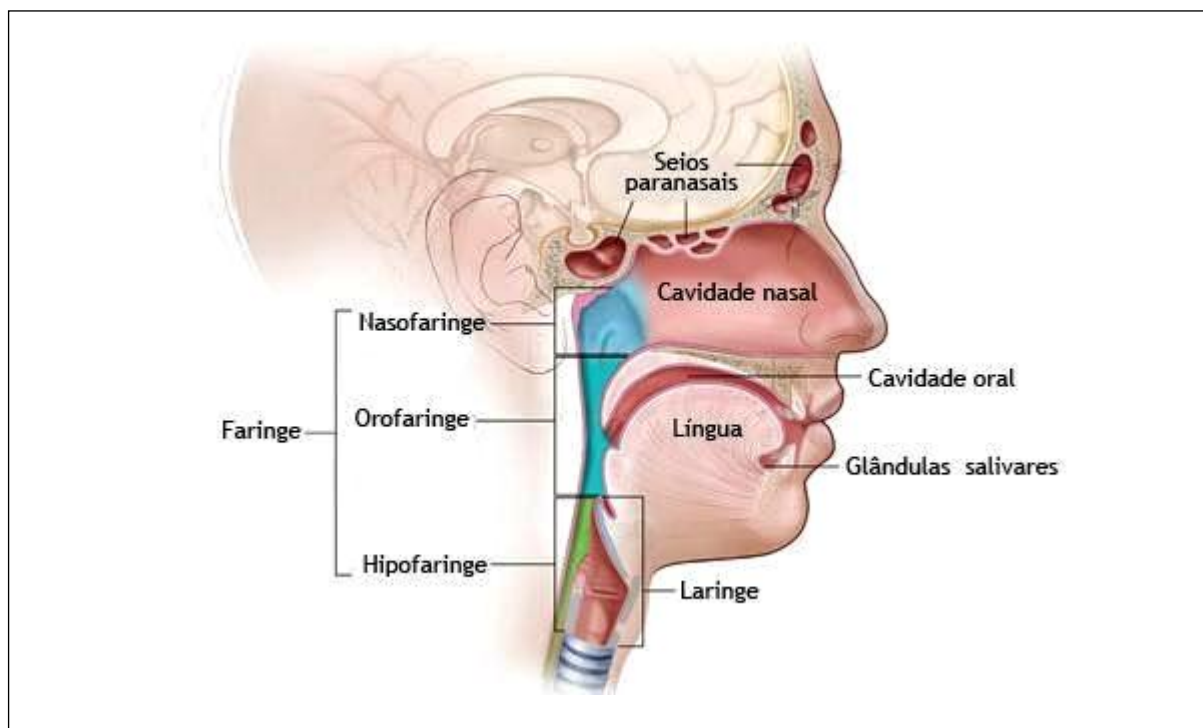


Figura 1. Regiões de ocorrência de câncer de cabeça e pescoço. Fonte: NIH web page <http://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/cancer-types/head-neck/headandneck-diagram.jpg>

O CCEB apresenta comportamento clínico diferenciado dependendo da sua localização anatômica e seu estadiamento clínico (uma das maneiras de descrever a extensão e a gravidade do câncer). A língua é o sítio com maior frequência de acometimento do CCEB (cerca de 44%) seguida do assoalho bucal (16%) (ALVES et al., 2011; INCA, 2014; MOGNETTI; DI CARLO; BERTA, 2006; RIVERA; VENEGAS, 2014; SCULLY; BAGAN, 2009). Dentre as características mais importantes do CCEB tem-se a elevada capacidade de invasividade local, metástase linfonodal e recorrência (FELLER; LEMMER, 2012; HWANG et al., 2012; WU et al., 2011). Diversos fatores tem sido implicados na sua etiologia. Dentre eles, alterações genéticas (ex. mutação dos genes p53, Bcl2) (HSIEH et al., 2001; RAHMANI et al., 2012), fatores extrínsecos (tabaco, álcool, radiação solar) (KUPFERMAN; MYERS, 2006), infecções virais (HPV) (SMITH et al., 2004) e alterações no sistema imunológico (SCULLY; BAGAN, 2009). Todos eles têm sido apontados como fatores desencadeantes e/ou sinérgicos do desenvolvimento do CCEB.

A abordagem terapêutica mais utilizada como tratamento do CCEB continua sendo ressecção cirúrgica com margem de segurança, podendo ser associada a radio e a quimioterapia (BESSELL et al., 2011). Entretanto, ao longo dos últimos 30 anos poucos avanços foram alcançados em relação ao prognóstico do CCEB, que permanece apresentando

taxa de mortalidade elevada (variando entre 50% a 70%) e sobrevida média de cinco anos após diagnóstico (FELLER; LEMMER, 2012; JOHNSON; DE COSTA; YOUNG, 2014).

O microambiente tumoral é composto pelas células neoplásicas (parenquimais) e pelas células do estroma, que é o arcabouço do tumor. Este arcabouço é composto por fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos, células endoteliais dentre outros componentes da matriz extracelular. O estroma e as células neoplásicas realizam uma comunicação mútua através de proteínas-sinal e a resposta inflamatória pode favorecer o escape das células malignas da vigilância imunológica (KOONTONGKAEW, 2013; SALO et al., 2014). As células malignas liberam fatores que modificam as células do estroma e enzimas proteolíticas que são capazes de modificar a matriz extracelular. O estroma, por sua vez, libera fatores que favorecem o crescimento e divisão das células neoplásicas além de fatores que também modificam a matriz extracelular (KOONTONGKAEW, 2013). Dentre as substâncias liberadas pelas células estromais estão as citocinas TNF- α e IL-1 β (GANNOT; BUCHNER; KEISARI, 2004), a quimiocina CCL3/MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein-1 alpha*) (NEGUS et al., 1997), o mediador lipídico fator de ativação plaquetária (PAF) (MELNIKOVA; BAR-ELI, 2007), dentre outros. As células neoplásicas também são capazes de liberar estes mediadores que contribuem para a modificação do perfil leucocitário do microambiente tumoral (BUSSOLATI et al., 2000; GANNOT et al., 2004) e podem estar associados à proliferação e invasividade tumorais (MANTOVANI et al., 2008). Exemplificando o envolvimento destes mediadores na progressão tumoral, tem-se a ativação do fator de transcrição NF-kB (*Nuclear factor-kappa B*). A ativação de NF-kB pela via de sinalização desencadeada pela ligação de TNF- α ou PAF aos seus respectivos receptores resulta na transcrição de genes anti-apoptóticos (Bcl-2) (MANTOVANI et al., 2008) que impedem a morte das células neoplásicas e genes codificadores de enzimas que degradam a matriz extracelular (Metaloproteinase - 9) (CHEN et al., 2015), etapa necessária para a invasão tumoral.

O Fator de Ativação Plaquetária (PAF)

Os fosfolipídios constituem a maior parte da membrana celular (ALBERTS et al., 2002). O metabolismo destas moléculas é realizado por enzimas lipolíticas denominadas fosfolipases. Basicamente, a função das fosfolipases é catalisar a hidrólise de glicerofosfolipídios da membrana celular originando lisofosfolipídios (que funcionam com moléculas de sinalização ou como precursores de outros mediadores) e ácidos graxos

(SHIMIZU, 2009). Dentre os tipos de fosfolipases, tem-se a fosfolipase A2 que se subdivide em outros tipos, segundo sua característica biológica, sendo elas: fosfolipase A2 secretória (sPLA2), fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), fosfolipase A2 cálcio-independente (iPLA2) e PAF acetilhidrolase (PAF-AHA) (SHIMIZU, 2009). A fosfolipase A2 é ativada tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. A principal característica da fosfolipase A2 é sua capacidade de remover o ácido graxo da posição C2 da molécula de fosfolipídio. Uma vez que a molécula de fosfolipídio foi hidrolisada pela cPLA2, ela se converte em dois componentes: lisofosfolipídio e ácido araquidônico (ISHII; NAGASE; SHIMIZU, 2002; ISHII; SHIMIZU, 2000).

O lisofosfolipídio pode ser metabolizado em mediadores inflamatórios. O fator de ativação plaquetária (PAF, 1-*O*-hexadecyl-2-acetoysl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) é um mediador inflamatório lipídico gerado via acetilação enzimática do precursor 1-*O*-hexadecyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lysoPAF). A síntese de PAF pode ocorrer por duas vias enzimáticas distintas: via *de novo* e remodelação. Em geral, tem-se que síntese de PAF através da via *de novo* ocorre em situações fisiológicas e a síntese pela via da remodelação em condições inflamatórias (TSOUPRAS et al., 2009). Esta última ocorre quando a molécula de lyso-PAF, produto intermediário do PAF, sofre a ação da enzima acetiltransferase (Acetil-CoA) se transformando, assim, no fator de ativação plaquetária (DENIZOT et al., 2001; MELNIKOVA, V. O.; VILLARES; BAR-ELI, 2008) (Figura 2). A bioatividade de PAF é regulada por enzimas denominadas PAF hidrolases, as quais convertem PAF de volta a lyso-PAF (DENIZOT et al., 2001; MELNIKOVA, V.; BAR-ELI, 2007; WELCH et al., 2009).

Diversas células sintetizam PAF e expressam seu receptor (PAFR – receptor do fator de ativação plaquetária). Desta maneira, elas podem produzir e sofrer a ação deste mediador lipídico cuja ligação ao receptor é específica. Dentre estas células podemos citar, macrófagos, basófilos, células endoteliais, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos e células neoplásicas (APONTE et al., 2008; FERREIRA et al., 2007).

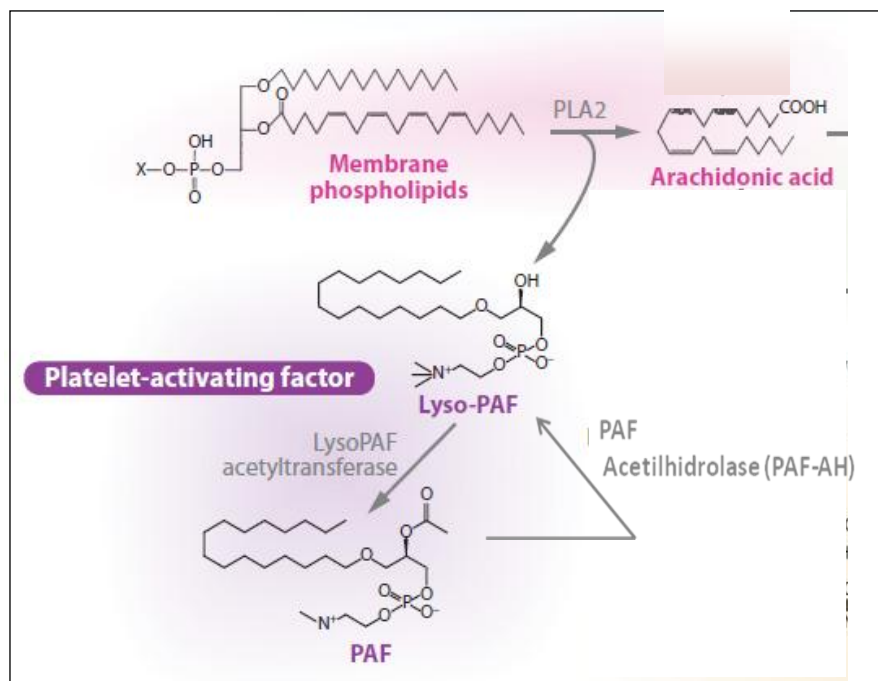


Figura 2. Esquema da síntese de PAF pela via da remodelação. Fonte: Adaptado de (SHIMIZU, 2009).

O receptor do fator de ativação plaquetária (PAFR) é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Quando ativado pelo seu ligante – o fator de ativação plaquetária (PAF) - esse receptor está envolvido na iniciação da sinalização celular através do aumento dos níveis de cálcio intracelular, *turnover* de fosfatidil-inositol e ativação de quinases (DORSAM; GUTKIND, 2007; KITAGAWA et al., 2007; SHINDOU et al., 2000). A ativação de vias de sinalização desencadeiam atividades biológicas variadas como a produção de fatores que aumentem a permeabilidade vascular, quimiotaxia de leucócitos, angiogênese, ativação de plaquetas e até oncogênicos (CHEN et al., 2015; MONTRUCCHIO et al., 1998). A atividade oncogênica mediada por PAF ocorre através da ativação da cascata de sinalização celular FAK/ PI3K/ AKT (Figura 3).

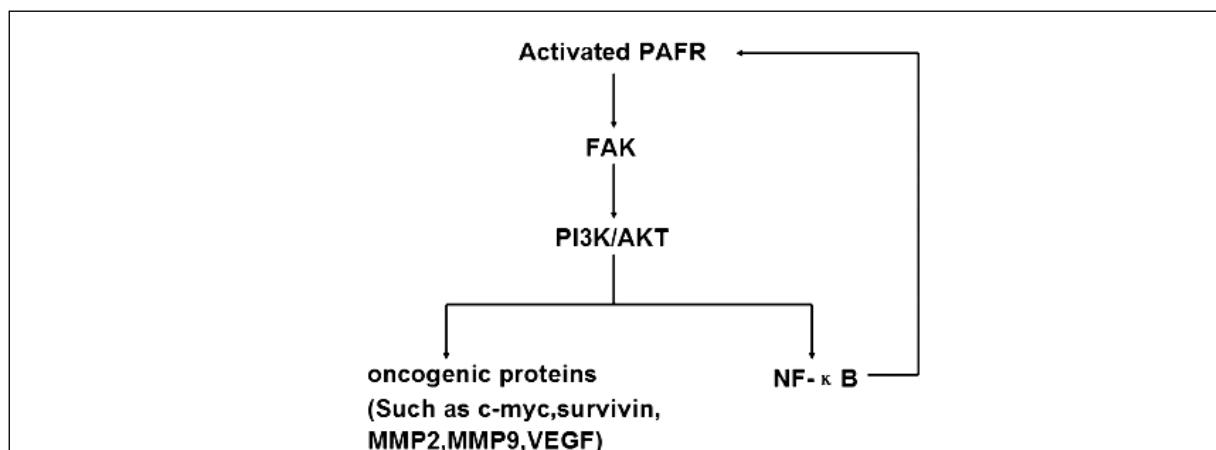


Figura 3. Diagrama esquemático da via de sinalização celular ativada por PAF. Fonte: (CHEN et al., 2015)

PAF e câncer

Vários estudos demonstraram o papel do PAF e seu receptor em tumores de origem epitelial. Por exemplo, (MONTRUCCHIO *et al.*, 1998) demonstraram que mulheres com câncer de mama primário apresentaram um elevado nível de PAF no tecido tumoral quando comparados aos tecidos mamários saudáveis. CHEN et al. (2015) demonstraram que a imunexpressão de PAF e PAFR eram maiores em amostras de carcinoma de células escamosas de esôfago em comparação ao tecido normal adjacente. Além disso, esta imunexpressão elevada foi positivamente correlacionada ao estágio avançado e metástase linfonodal.

O sistema imunológico exerce um importante papel na vigilância tumoral e falhas neste sistema podem resultar em progressão neoplásica (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Modelos de tumorigênese tem demonstrado que a progressão tumoral é acompanhada da diminuição de células inflamatórias, corroborando com hipótese de escape da vigilância imunológica para progressão da neoplasia (NAKASONE et al., 2012). De forma inversa, outros estudos mostraram que o aumento de determinadas células do sistema imune no microambiente tumoral pode contribuir para a progressão da doença (BELAI et al., 2014). Em geral, o papel da inflamação e do sistema imunológico na tumorigênese permanecem controversos, podendo funcionar como inibidores ou facilitadores da promoção e progressão tumoral (BEKTAŞ-KAYHAN, 2012).

Dentre as estratégias utilizadas pelas células neoplásicas para escaparem da vigilância imunológica é a liberação de fatores quimiotáticos para plaquetas, como o PAF. Uma das hipóteses é que a adesão de plaquetas na célula tumoral impeça o reconhecimento por células

imunes, as quais aderem ao seu redor, formando um trombo e assim impedindo que as células imunes as identifique (WARD, 2002). As células tumorais dependem de vascularização para sua sobrevivência. Sendo assim, fatores que promovem a angiogênese podem ser alvos terapêuticos no combate à progressão tumoral. Neste sentido, o PAF apresenta capacidade de induzir a liberação de fatores pró-angiogênicos como, por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (MONTRUCCHIO et al., 1998; TSOUPRAS et al., 2009). Desta forma, este mediador tem sido relacionado a diversas fases da progressão tumoral, como no crescimento tumoral, na angiogênese (FERREIRA et al., 2004) e na metástase (MCHOWAT et al., 2011). Estudos realizados em modelos de melanoma e câncer de mama utilizando camundongos tem demonstrado uma provável participação do PAF (BRAEUER et al., 2011; MONTRUCCHIO et al., 1998) ou do PAFR (BACHI et al., 2012) na progressão tumoral via seu papel na neoangiogênese. IM et al. (1996) demonstraram em modelo murino de melanoma que PAF aumenta a atividade metastática para o pulmão e que essa atividade é mediada pelo aumento de TNF- α . Estudos clínicos demonstraram aumento de PAF no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama (MONTRUCCHIO et al., 1998). O aumento da concentração de PAF em indivíduos com carcinoma colorretal foi demonstrado nos estágios sem metastatização (DENIZOT et al., 2003). Em 2001, DENIZOT et al. compararam a concentração plasmática de PAF em pacientes com câncer de pulmão em relação a indivíduos saudáveis e não foram encontradas diferenças entre os grupos. Entretanto, nos indivíduos com câncer de pulmão, observou-se um aumento na concentração da acetilhidrolase (AHA) – enzima que inativa o PAF. Em 2005, DENIZOT et al. avaliaram a concentração de PAF em pacientes com câncer da tireóide e obtiveram resultados similares aos encontrados para o câncer de pulmão.

Com relação ao câncer de boca, PAF e PAFR não existem estudos disponíveis na literatura.

Modelo de carcinogênese bucal

O uso de carcinógeno químico para induzir câncer bucal é uma estratégia de estudo de tumorigênese *in vivo*. Dentre os carcinógenos mais comumente utilizados nos estudos de tumorigênese destacam-se o DMBA (7,12-dimethylbenz [a] anthracene) e o 4NQO (4-nitroquinolina-1-óxido). O DMBA é capaz de induzir lesões potencialmente malignas na mucosa da bochecha de hamsters Sírios após repetidas aplicações durante 14 semanas (LU; HERRINGTON; WANG, 2006). Neste modelo é possível observar alterações genéticas/

epigenéticas similares às encontradas no câncer de cabeça e pescoço em humanos, como por exemplo mutação do gene H-ras e elevados níveis de TGF β 1 (Fator de crescimento transformador *beta* 1) (LINGEN et al., 1997; ZENKLUSEN et al., 1994). Entretanto, os tumores originados na mucosa dos hamsters a partir deste modelo não se assemelham histologicamente ao câncer de boca em humanos (CHEN, et al., 2011; YANG; ZHOU; GE, 2006).

Na literatura é bem estabelecido a relação do tabaco com o desenvolvimento do câncer de boca. Dessa maneira, diversos modelos tem tentado mimetizar o uso do tabaco no desenvolvimento do CCEB. Muitos dos carcinógenos presentes no tabaco atuam formando adutos cíclicos no DNA. O carcinógeno sintético 4NQO é derivado de uma quinolina, solúvel em água e causa a formação de adutos cíclicos que resultam na substituição das bases adenina por guanina além de induzir mutações no gene H-ras. Este modelo requer uma exposição ao carcinógeno por um período de 8 a 24 semanas, quando diluído em água e de 12 a 16 semanas quando pincelado em língua de camundongos ou ratos. O uso deste carcinógeno possibilita acompanhar transformação maligna do tecido sadio com estágios similares aos encontrados em humanos (GANNOT et al., 2004; LI et al., 2013; MARTÍNEZ, 2012; TANG et al., 2004). Ele é capaz de induzir as fases sequenciais da carcinogênese (hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma *in situ* e CCEB) (WILKEY et al., 2009). Além disso, o 4NQO induz a sequência de estágios observada na carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) produzindo desta forma, mudanças morfológicas e moleculares, de forma semelhante àquelas observadas na carcinogênese oral em humanos (KANOJIA; VAIDYA, 2006; TANG et al., 2004) As lesões decorrentes do uso do 4NQO são histopatologicamente similares às lesões CCEB em humanos (GANNOT et al., 2004)

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do fator de ativação plaquetária (PAF) na carcinogênese bucal experimental e no processo de invasão tumoral induzida por 4NQO e em ensaios *in vitro* de invasão celular com linhagens de CCEB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. *In vivo*, usando modelo de carcinogênese bucal avaliar o curso da progressão tumoral em camundongos selvagens (WT) e deficientes do receptor de PAF (PAFRKO) das linhagens C57BL/6 e BALB/c;
2. *In vitro*, avaliar os efeitos do antagonista de PAFR (UK-74,505) na invasão celular utilizando linhagens de CCEB metastático (HN12) e não metastático (HN13).

METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 e BALB/c (selvagens – *wild type* – WT) e deficientes para o receptor de PAF (PAFR^{-/-} - *knockout* - KO) entre 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com dieta –padrão para camundongo e água *ad libitum*, no biotério do laboratório de Imunofarmacologia e no Laboratório de Integração Micro-organismo-Hospedeiro (LIMHO - ICB). Os camundongos PAFRKO de ambas as linhagens foram gerados como previamente descrito (ISHII et al., 1998) e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais.

Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram executados após aprovação do Comitê Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG), protocolo nº 12/2011.

Modelo experimental da carcinogênese bucal

Os camundongos do grupo experimental (4NQO) receberam o tratamento com o carcinógeno diariamente durante 28 semanas. Seguindo o protocolo previamente descrito por Tang *et al.* (2004), utilizou-se o carcinógeno químico 4NQO (4-Nitroquinoline-1-Oxide) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) diluído em Etilenoglicol PA (Sigma Aldrich) em uma concentração inicial de 5 mg/mL e distribuída em alíquotas estocadas em freezer -20°C. Semanalmente, estas alíquotas foram diluídas na água de beber dos camundongos obtendo-se concentração final de 50 µg/ml). As garrafas de polivinil foram protegidas da luz ambiente. Os camundongos do grupo controle receberam água filtrada sem 4NQO (Figura 4). Os camundongos tiveram monitoramento do peso corporal inicial e final ao longo do período experimental.

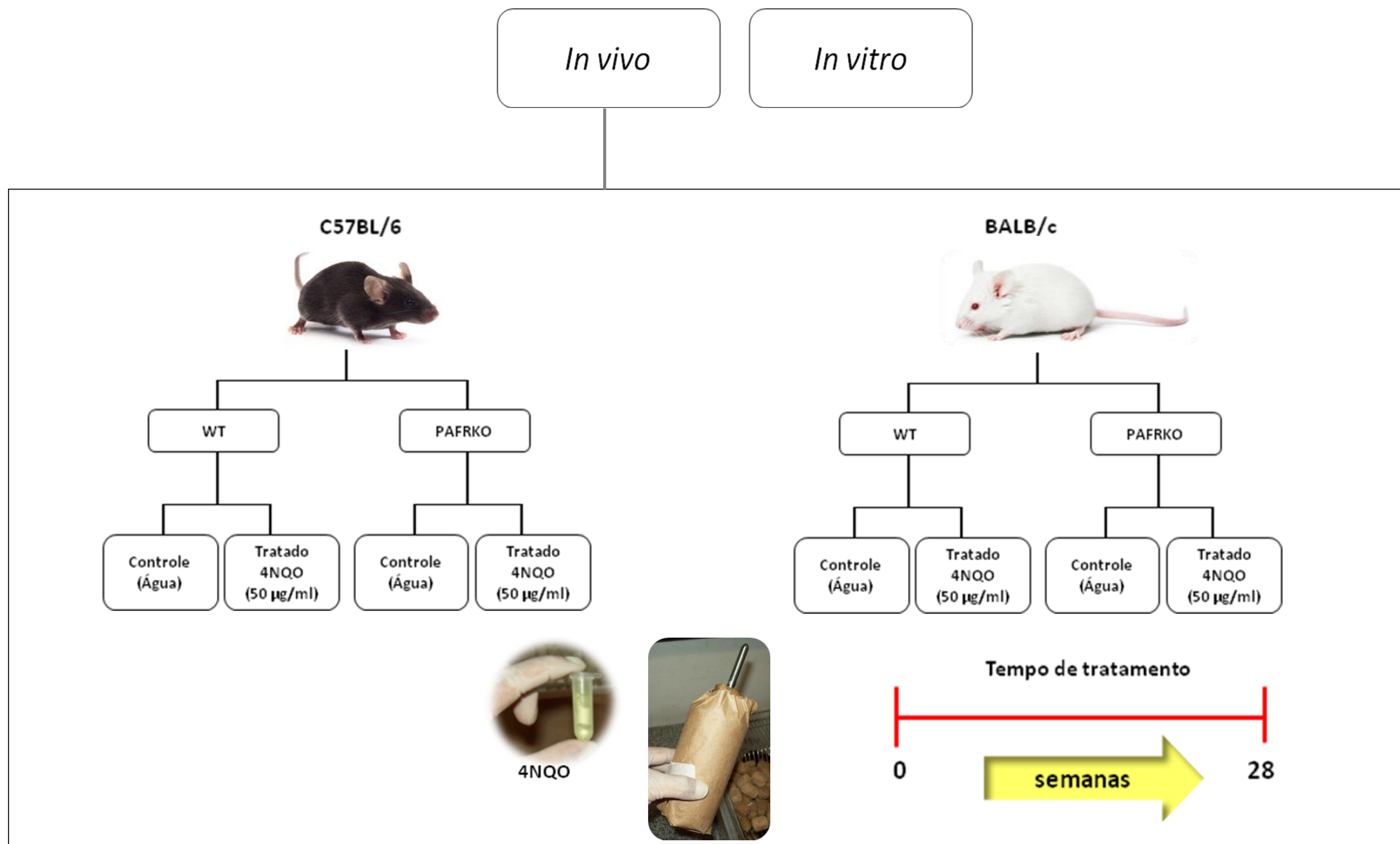


Figura 4. Esquema do modelo experimental de carcinogênese bucal. Fonte: Autora.

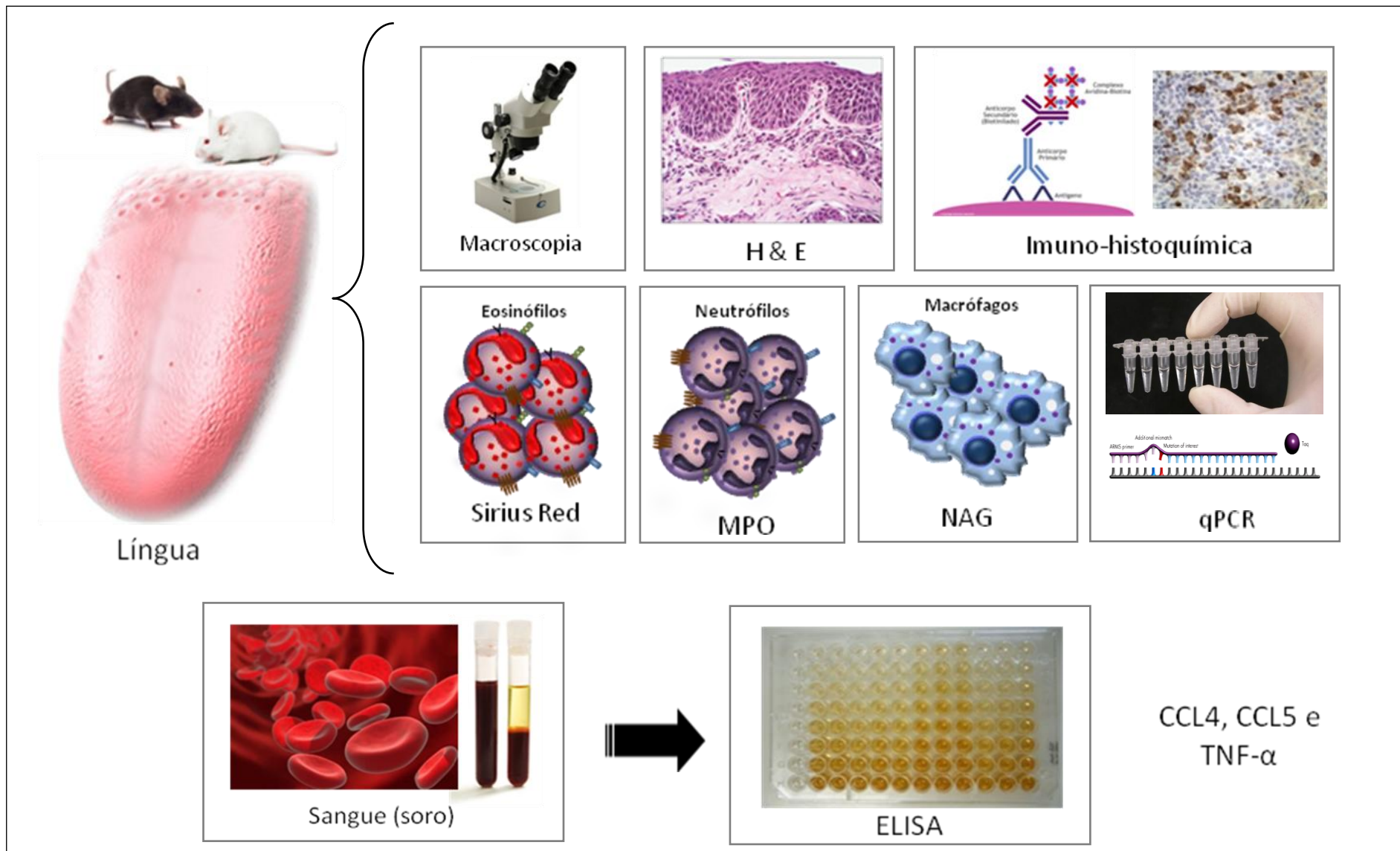


Figura 5: Esquema das análises realizadas na língua e soro dos camundongos. Fonte: Autora.

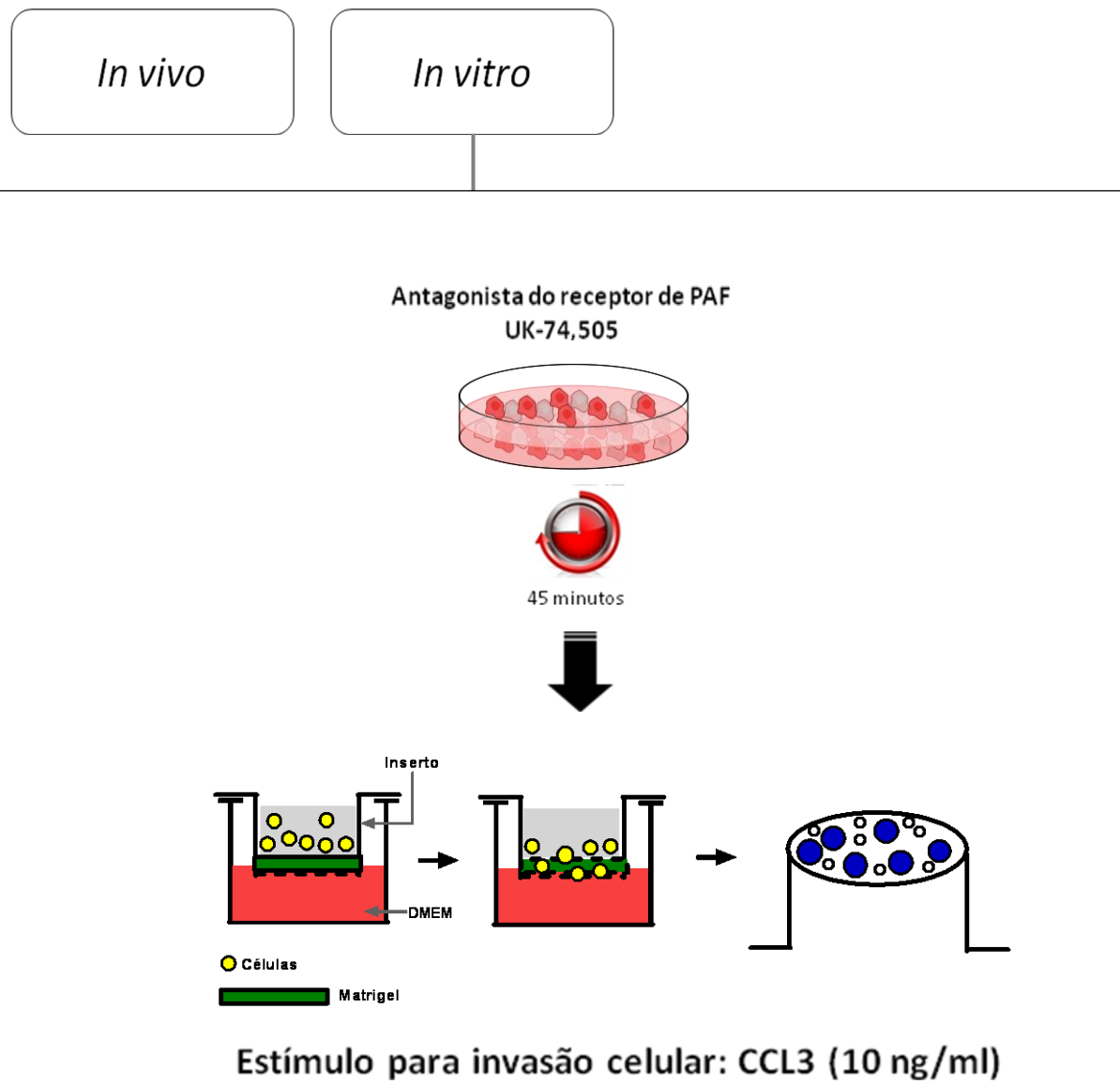


Figura 6: Esquema dos ensaios *in vitro* com linhagens de CCEB.

2. Eutanásia e coleta de tecidos

Após um período de 28 semanas de tratamento com 4NQO, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (100 mg/mL) e xilazina (20 mg/mL) por via intraperitoneal. O sangue dos animais foi coletado por meio de punção cardíaca, centrifugado e o soro armazenado a -20°C para posterior análise. Após o deslocamento cervical, foram coletados os seguintes órgãos/tecidos: língua, linfonodos cervicais, fígado, estômago, duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso. Após a coleta das línguas, as mesmas foram identificadas e fotografadas para análise macroscópica. Posteriormente, a língua e os outros órgãos foram fixados em solução tamponada de Formaldeído 10% para processamento histológico (Figura 5).

Experimentos adicionais foram realizados e fragmentos de língua foram coletados a fresco e imediatamente armazenados em freezer -20°C para a realização dos ensaios imunoenzimáticos de mieloperoxidase neutrofílica (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

Para o ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real (qPCR), os fragmentos das lesões linguais foram congelados previamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C.

3. Análise macroscópica

A língua dos camundongos dos grupos controle e experimental foram individualmente fotografadas com régua milimetrada, utilizando-se câmera fotográfica acoplada a uma lupa estereomicroscópica (Carl Zeiss, Oberkochen, Badden-Wütemberg, Germany). As imagens produzidas foram posteriormente analisadas para avaliação da área e tamanho das lesões linguais utilizando-se o Software ImageJ.

4. Análise Histopatológica

A língua e os tecidos fixados foram submetidos ao processamento histotécnico de rotina em processador automático (PT Mono 2000, Lupe, São Carlos, São Paulo, Brasil). As línguas foram cortadas no sentido ântero-posterior de seu maior eixo e as metades incluídas de maneira que permitisse a obtenção de cortes no plano sagital. Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), para gradação da displasia

epitelial utilizando critérios da Organização Mundial de Saúde (BARNES; EVESON; REICHART, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios utilizados para a gradação de displasia

Arquitetura	Alterações Celulares
Estratificação epitelial irregular	Alteração do tamanho nuclear e celular
Perda de polarização das células basais	Pleomorfismo nuclear e celular
Projeções epiteliais em forma de gota	Aumento da proporção núcleo/ citoplasma
Aumento do número de mitoses	Núcleo aumentado de tamanho
Mitoses superficiais atípicas	Figuras de mitoses atípicas
Queratinização prematura das células	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Presença de pérolas de queratina	Hipercromatismo

Fonte: Organização Mundial de Saúde (BARNES; EVESON; REICHART, 2005)

As lesões em língua foram classificadas conforme previamente descrito por Silva (2012):

Escore 0 – displasia ausente (tecido epitelial normal, sem alterações);

Escore 1 – displasia leve (alterações limitadas ao terço basal do epitélio);

Escore 2 – displasia moderada (alterações representando dois terços do epitélio);

Escore 3 – displasia grave (alterações representando mais de dois terços do epitélio);

Escore 4 – carcinoma *in situ* (alterações em toda espessura epitelial, porém sem envolvimento do tecido conjuntivo);

Escore 5 – carcinoma invasivo (ilhas carcinomatosas dentro do tecido conjuntivo);

A análise microscópica consistiu na observação de 5 campos consecutivos representativos (iniciando-se pelo campo com maior severidade) em 2 cortes e nos aumentos de 100 e 400 vezes. A avaliação foi executada por dois examinadores cegos diante do *status* dos grupos. Imagens representativas de cada grupo foram capturadas no Microscópio Olympus (Carl Zeiss Bx41).

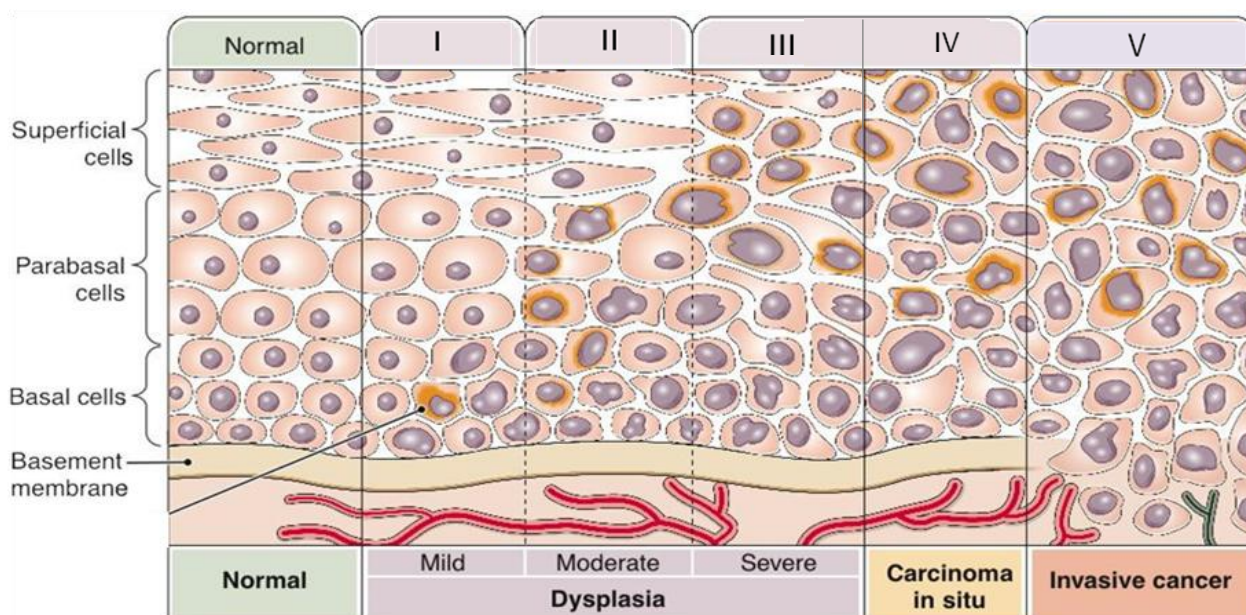


Figura 7: Representação esquemática da gradação histopatológica de displasia epitelial na língua dos camundongos.

Fonte: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/651/flashcards/1059651/jpg/90981fig2111334008594771.jpg>

Análise de proliferação celular

Secções das lesões (3 μ m) foram colhidas em lâminas com carga elétrica (Starfrost®) foram submetidas a reações de imunohistoquímica utilizando o método da estreptavidina-biotina-imunoperoxidase. Resumidamente, as amostras foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em água destilada. Então, foram incubadas com dois banhos de peróxido de hidrogênio a 3% (*Hydrogen Peroxide* 30%, Perhydrol®, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) por 15 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada em Tampão Citrato 10 Mm (pH 6.0) a 96°C em banho-maria. Após a incubação *overnight* com o anticorpo Mouse monoclonal anti-human PCNA (diluição 1:500) (Clone PC-100, Dako, Glostrup, Denmark) os cortes foram incubados com o kit Multi-Link (sistema LSAB/HRP, Dako, código K0690) seguindo-se as instruções do fabricante. A reação foi revelada pela da incubação com solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Dako), durante 1 minuto. Finalmente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com Permount (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA). Controles negativos foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário, os quais foram substituídos por PBS-BSA a 1%. As células imunomarcadas foram analisadas por microscopia de luz (Axioskop 40 ZEISS; Carl Zeiss, Oberkochen, Badden-Wütemberg, Germany), no aumento de 100 vezes e contadas nas camadas epiteliais, numa área total de 20

campos consecutivos, em dois cortes. Os valores foram expressos como (média $\pm$ desvio padrão) de células PCNA positivas (PCNA⁺) por campo na camada suprabasal.

5. Coloração Histoquímica – Sírius Red

Para investigar presença de eosinófilos nas lesões linguais, utilizou-se o corante Sirius Red (Sigma-Aldrich) conforme descrito por Llewellyn (1970), e adaptado por Meyerholz et al. (2009) com a eliminação do passo de cloreto de sódio. Lâminas com cortes de língua com 3 μ m de espessura foram incubadas em hematoxilina de Harris por dois minutos e lavadas em água corrente, seguido de lavagem em etanol absoluto. As lâminas foram então submersas numa solução alcalina (pH 8-9) de Sirius Red (5 mg/ml) por duas horas e lavadas em água corrente. Os eosinófilos corados foram quantificados em toda extensão da lâmina própria, sob a camada epitelial, no aumento de 400 vezes. Os resultados foram expressos como (mediana $\pm$ desvio padrão) de eosinófilos por campo.

6. Ensaio da mieloperoxidase (MPO)

Os fragmentos das lesões linguais foram suspensas em 1.9 ml/ 100 mg tecido de Tampão 1 (NaCl 0.1 M, NaPO₄ 0.02 M, NaEDTA 0.015 M, pH 7) e maceradas em homogeneizador (Power Gen 125 - Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). Logo em seguida, foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* (tecido processado) foi submetido à lise de hemácias através da adição de 1.5 mL de NaCl 0.2% e, após um período de aproximadamente 30 segundos, foi feita a adição de 1.5 mL de solução de NaCl 1.6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e novamente centrifugada a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspendidos em tampão fosfato (0.05 M de Na₃PO₄, 0.5% de HETAB e pH 5.4). Após homogeneização, os *pellets* foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. e o sobrenadante coletado para o ensaio de MPO. A reação de MPO se inicia com a adição de 25 μ L de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Aldrich) diluída em dimetilsulfoxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) na concentração final de 1.6mM em uma placa de 96 poços (NUNC). A placa é levada a uma estufa a 37°C por 5 minutos e depois são adicionados 100 μ L de peróxido de hidrogênio 0.002% em tampão fosfato seguido de nova incubação a

37°C por 5 minutos. Finalmente, foram adicionados 100 µL de H₂SO₄ e a atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras (1:5) foi determinada através do leitor Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) na absorbância de 450 nm (FERREIRA et al., 2007). Os resultados foram expressos em número relativo de neutrófilos por miligrama (mg) de tecido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como número relativos de neutrófilos (REZENDE, 2012).

7. Ensaio de n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Os fragmentos das lesões linguais foram suspensas em 1.9 ml/ 100 mg tecido de Tampão 1 (NaCl 0.1 M, NaPO₄ 0.02 M, NaEDTA 0.015 M, pH 7) e maceradas em homogeneizador (Power Gen 125 - Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). Logo em seguida, foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* (tecido processado) foi submetido à lise de hemácias através da adição de 1.5 mL de NaCl 0.2% e, após um período de aproximadamente 30 segundos, foi feita a adição de 1.5 mL de solução de NaCl 1.6% com glicose 5%. A solução final foi homogeneizada e novamente centrifugada a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspendidos em solução salina 0,9% contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck Millipore). O *pellet* foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM e o sobrenadante diluído na proporção de 1:2 em tampão citrato/fosfato (Ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.1M, pH 4.5). Foram utilizados 100 µL de amostra e adicionado 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminidina (Sigma Aldrich) diluído em tampão citrato/fosfato. Após incubação a 37°C por 10 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 100 µL tampão glicina 0.2 M (pH 10.6) e a densidade de macrófagos foi calculada com base na absorbância das amostras a 405 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). Utilizou-se uma curva-padrão de NAG feita com diluições seriadas de macrófagos peritoneais, em concentração conhecida, recolhidos de camundongos estimulados com tioglicolato 3% (BARCELOS et al., 2005). Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como número relativos de macrófagos (REZENDE, 2012).

8. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

No soro total foram medidas as concentrações de CCL4, CCL5 e TNF- α . Para tal, utilizou-se *kits* específicos (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as placas foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos durante aproximadamente 18 horas em temperatura ambiente. Foi acrescentado PBS contendo 1% de albumina bovina por duas horas seguida de lavagem. Em seguida as amostras (50 μ l) foram pipetadas na placa. O tempo médio de incubação foi de 18 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos de detecção foram então adicionados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. A reação foi revelada pela adição de estreptavidina conjugada com peroxidase e OPD (“o-phenylendiamine dihydrochloride”) (Sigma Aldrich). Finalmente, foi acrescentado solução de H₂SO₄ a 1M. A absorbância das amostras foi obtida em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml (mediana $\pm$ desvio padrão).

9. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A extração do RNA total a partir de lesões linguais foi realizada com o kit RNeasyFFPE (Qiagen Inc., Valência, California, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade das amostras de RNA foi verificada através de análise de 1 mg de RNA total no aparelho 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado utilizando-se 3 μ g de RNA através de reação de transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen Corporation, Carlsbad, Californias, USA). A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Viia7 (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) usando-se painel personalizado contendo alvos de “*WoundHealing*” (PAMM-121) e “*Inflammatory cytokines and receptors*” (PAMM-011) para o perfil de expressão gênica. Utilizando-se o software online RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (SABiosciences, Frederick, Maryland, USA), os dados obtidos foram inicialmente normalizados pela média geométrica dos três genes constitutivos (GAPDH e HPRT). Subsequentemente, os dados foram normalizados pelo grupo controle e expressos como *fold change increase* em relação ao grupo controle (WT C57BL/6 tratado *versus* não tratado) e tratado (WT C57BL/6 tratado *versus* PAFRKO tratado).

10. Ensaios *in vitro*

Para realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas as linhagens tumorigênicas HN12 (*Head and Neck 12* - derivada de células de linfonodo metastático de paciente com carcinoma de células escamosas de boca primário) e HN13 (*Head and Neck 13* - derivadas de paciente com carcinoma de células escamosa de boca em língua) (CARDINALI et al., 1995). Os ensaios de invasão *in vitro* foram realizados em placas de 24 poços (Corning, Inc., New York, New York, USA), utilizando insertos modificados de Boyden com um filtro de membrana de polycarbonato contendo poros de 8 microns. Para o ensaio, a Matrigel (BD Biosciences, San Jose, California, USA) foi diluída 1:1 em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, USA) isento de soro e utilizada para revestir o filtro de membrana do inserto. Parte das células foram pré-tratadas com antagonista do receptor de PAF (UK-74,505) por 45 minutos na concentração de 10^{-7} M (MADEIRA et al., 2013). Este fármaco é um potente antagonista do receptor de PAF que possui tempo de ação prolongado e lenta dissociação do receptor (PONS et al., 1993). Ele foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza, do Laboratório de Interação Micro-organismo-Hospedeiro (LIMHO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Posteriormente, as células HN12 e HN13 (1×10^5) foram suspensas em 250 µl de DMEM isento de soro e colocadas sobre a parte superior do inserto. Colocou-se CCL3 10 ng/mL (Human Recombinant CCL3/ MIP-1α, catalog number DY270-05) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) diluída em DMEM isento de soro dentro do poço e em contato com a parte inferior do inserto para estimulação celular. Após 72 horas de incubação, o inserto foi removido e teve seu filtro de membrana fixado em solução tamponada de fomaldeído 10% durante 15 minutos. As células que migraram para a superfície inferior do inserto foram coradas com Giemsa (Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 6). Fotografou-se seis campos aleatórios em ampliação de 200 vezes utilizando-se microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40) e as imagens foram processadas usando o Software AxioVision Rel. 4.8.2. As células foram contadas nos seis campos capturados utilizando-se o software ImageJ. Os dados foram expressos como média ($\pm$ desvio padrão) de células por campo.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ DPM (desvio-padrão da média). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0. O teste de Mann-Whitney, Teste t ou Análise de Variância (ANOVA) foram utilizados para comparar dois ou mais grupos experimentais, respectivamente. No caso de observação de significância estatística no teste ANOVA, foi realizado pós-teste *Student-Newman-Keuls*. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0.05$.

RESULTADOS

Aspectos macroscópicos

Após tratamento com 4NQO na dose de 50 µg/ml durante 28 semanas, todos os camundongos da linhagem C57BL/6 apresentaram lesões em língua. Não foram observadas diferenças nos aspectos clínicos/macroscópicos destas lesões entre os grupos WT C57BL/6 e PAFRKO, sendo as lesões em sua totalidade de aspecto exofítico com base séssil, superfície verruciforme e coloração esbranquiçada (Figura 8). Os camundongos dos grupos controle, que não receberam o tratamento com carcinógeno 4NQO, não apresentaram formações de lesões ou quaisquer outras alterações macroscópicas em língua (Figura 8 C).

As lesões linguais nos camundongos *Wild-type* (WT) apresentaram-se em maior número e com maior área em relação às lesões observadas nas línguas dos camundongos PAFRKO, porém, estas diferenças não foram significativas (Figura 9).

O tratamento com o carcinógeno não alterou o peso corporal dos animais de ambas as linhagens submetidas ou não ao tratamento com 4NQO; exceto para os camundongos PAFRKO que apresentaram um aumento do peso corporal no final do período de tratamento comparado ao inicial (dado não mostrado).

Paralelamente realizamos experimentos com camundongos deficientes do PAFR cujo *background* era BALB/c. Da mesma forma as duas linhagens foram submetidas ou não ao tratamento com 4NQO durante 28 semanas. Os resultados não apontaram diferenças macroscópicas nas lesões linguais comparando-se os animais PAFRKO e WT BALB/c (Figura 10).

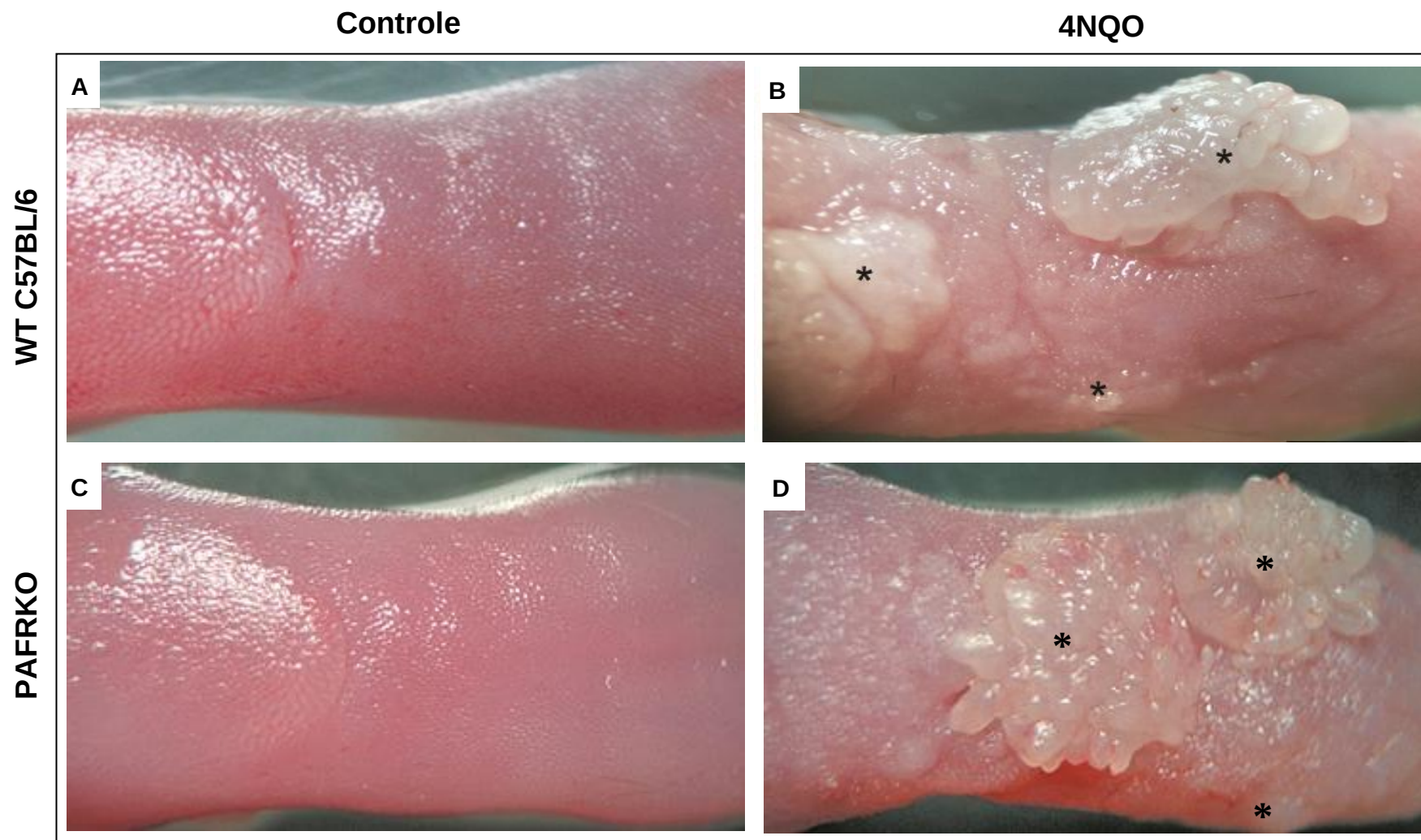


Figura 8. Aspecto macroscópico representativo das lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. A - WT C57BL/6 não tratado (controle). B – WT C57BL/6 tratado com 4NQO. C – PAFRKO não tratado (controle). D –PAFRKO tratado com 4NQO

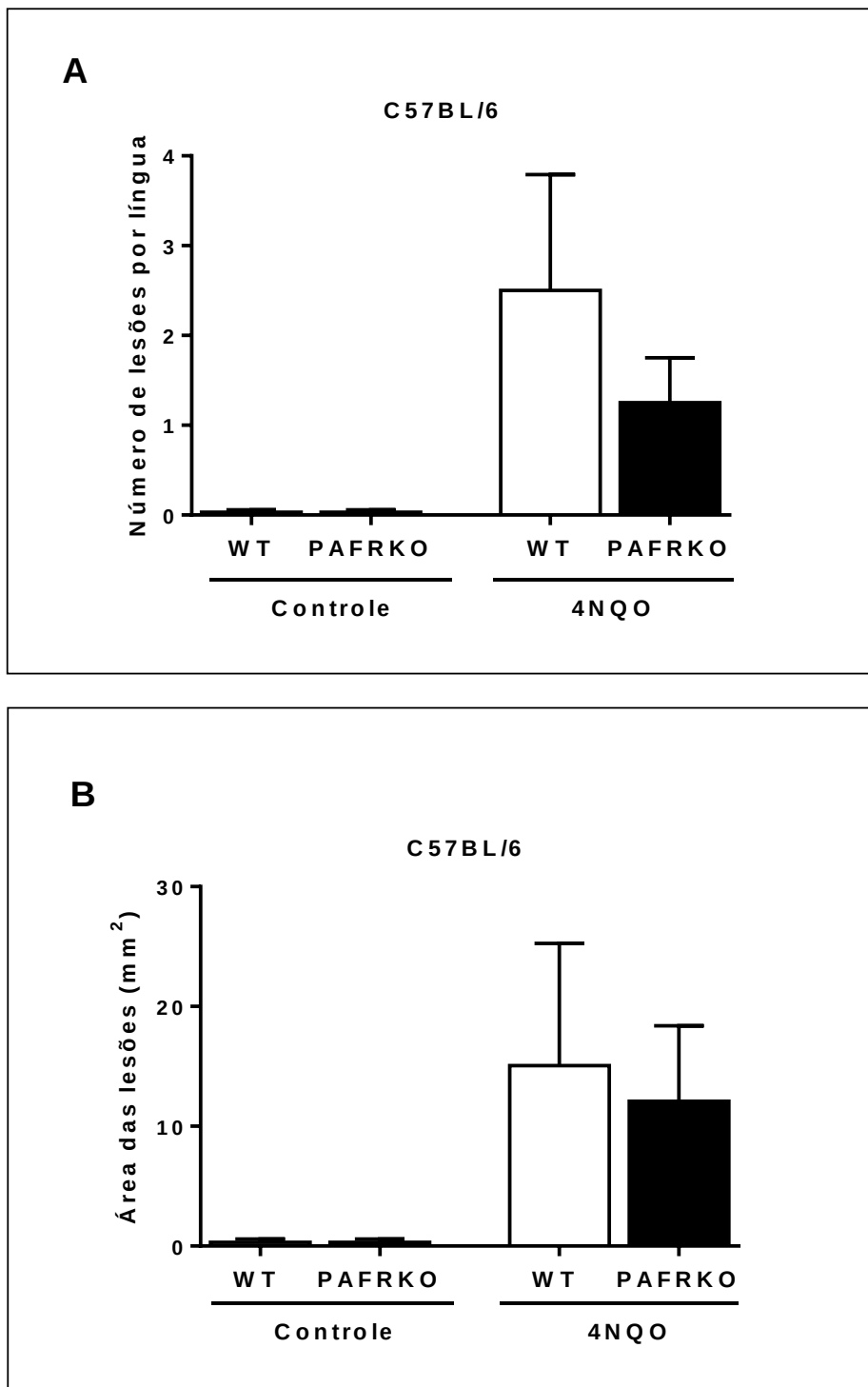


Figura 9. Achados macroscópicos das lesões em língua de camundongos C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. A – Número de lesões. B – Área média das lesões. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

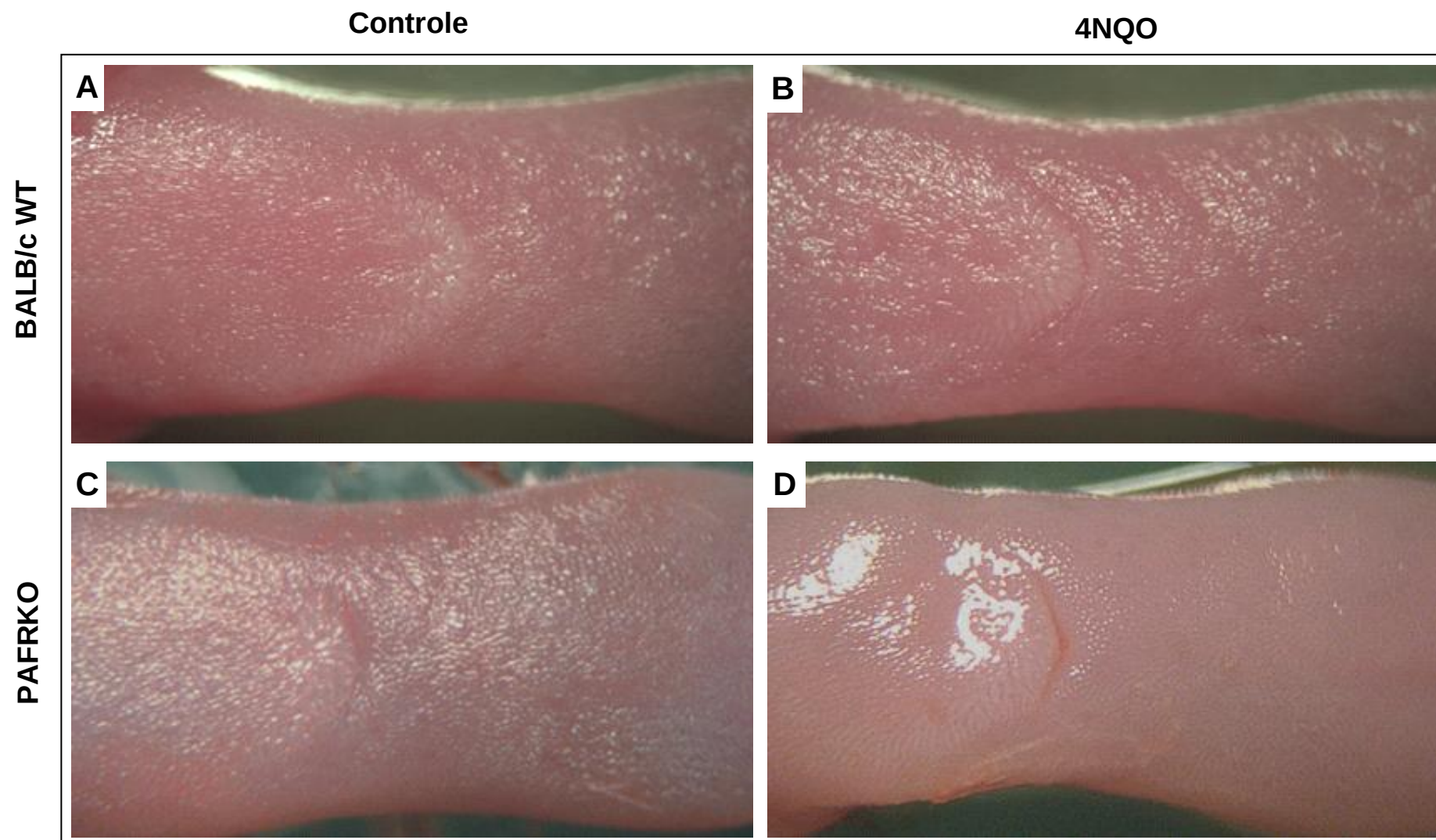


Figura 10. Aspecto macroscópico representativo das lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. A – BALB/c WT não tratado (controle). B – BALB/c WT tratado com 4NQO. C – PAFRKO não tratado (controle). D – PAFRKO tratado com 4NQO.

Aspectos microscópicos

A análise microscópica das lesões em língua dos camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6 tratados com 4NQO revelaram epitélio com alterações displásicas, as quais receberam escore histopatológico variando entre os graus 4 (carcinoma *in situ*) e 5 (carcinoma invasivo) (Figura 11 e Tabela 2), não havendo diferenças entre os dois grupos.

Tabela 2. Classificação histopatológica da displasia epitelial nas lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.

Linhagem	WT C57BL/6		PAFRKO	
	Controle	4NQO	Controle	4NQO
Escore 0	5	0	5	0
Escore 1	-	-	-	-
Escore 2	-	-	-	-
Escore 3	-	-	-	-
Escore 4	-	3	-	3
Escore 5	-	2	-	2

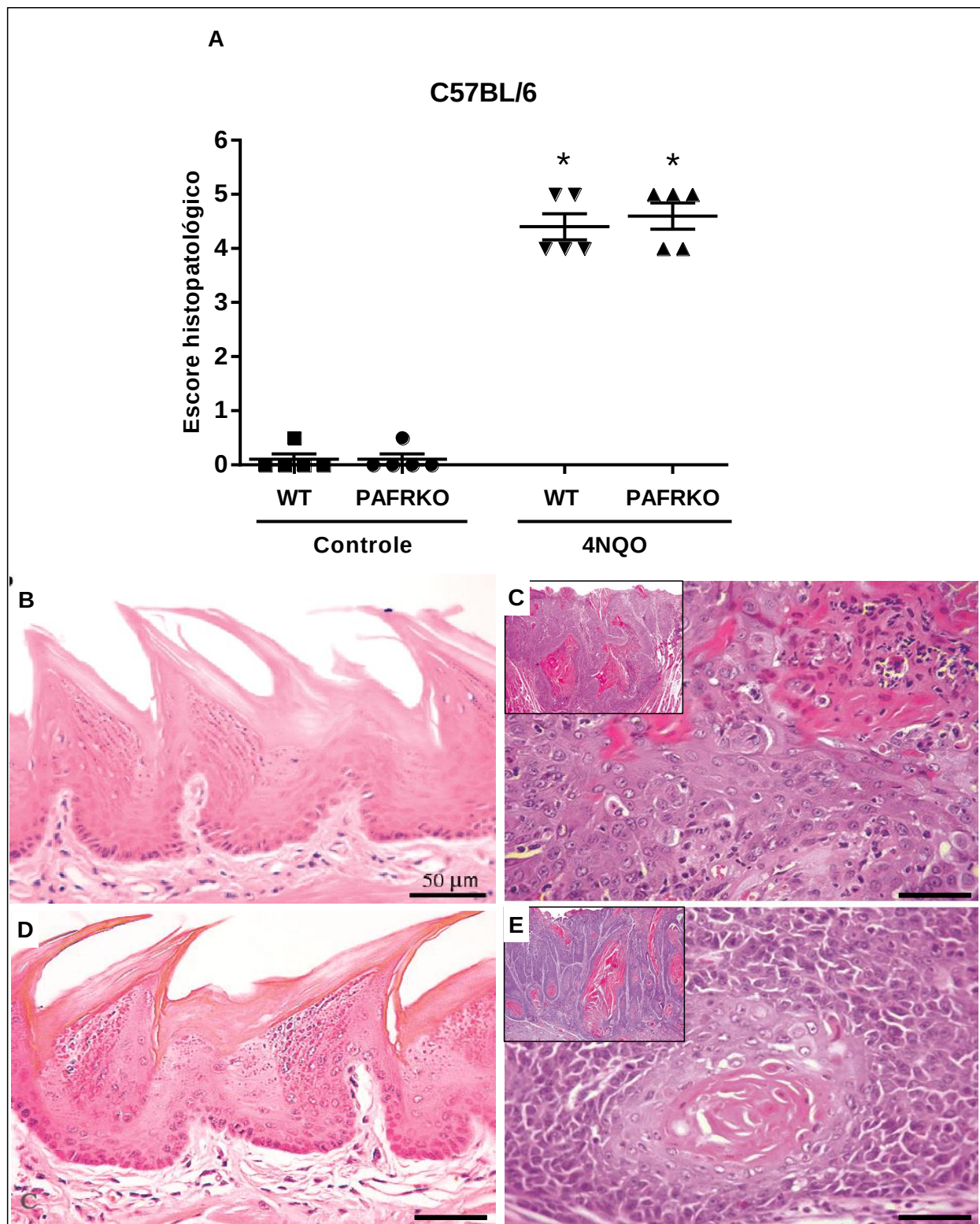


Figura 11. Escore histopatológico (A) e aspectos microscópicos representativos (B-E) das lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 μ g/ml) durante 28 semanas. B – WT C57BL/6 não tratado (controle). C – WT C57BL/6 tratado com 4NQO; D – PAFRKO não tratado; E – PAFRKO tratado com 4NQO. Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle). Dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão

Com relação aos animais WT BALB/c tratados com 4NQO, as alterações displásicas no epitélio obtiveram escore variando entre 1 (displasia leve) e 3 (displasia severa). As alterações displásicas encontradas nas lesões de língua dos camundongos PAFRKO tratados com 4NQO foram menores quando comparadas às alterações observadas para os camundongos WT BALB/c tratados (Figura 12 e Tabela 3).

Tabela 3. Classificação histopatológica da displasia epitelial nas lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas.

Linhagem	WT BALB/c		PAFRKO	
Grupo	Controle	4NQO	Controle	4NQO
Escore 0	4	0	4	2
Escore 1	1	2	1	3
Escore 2	-	1	-	-
Escore 3	-	2	-	-
Escore 4	-	-	-	-
Escore 5	-	-	-	-

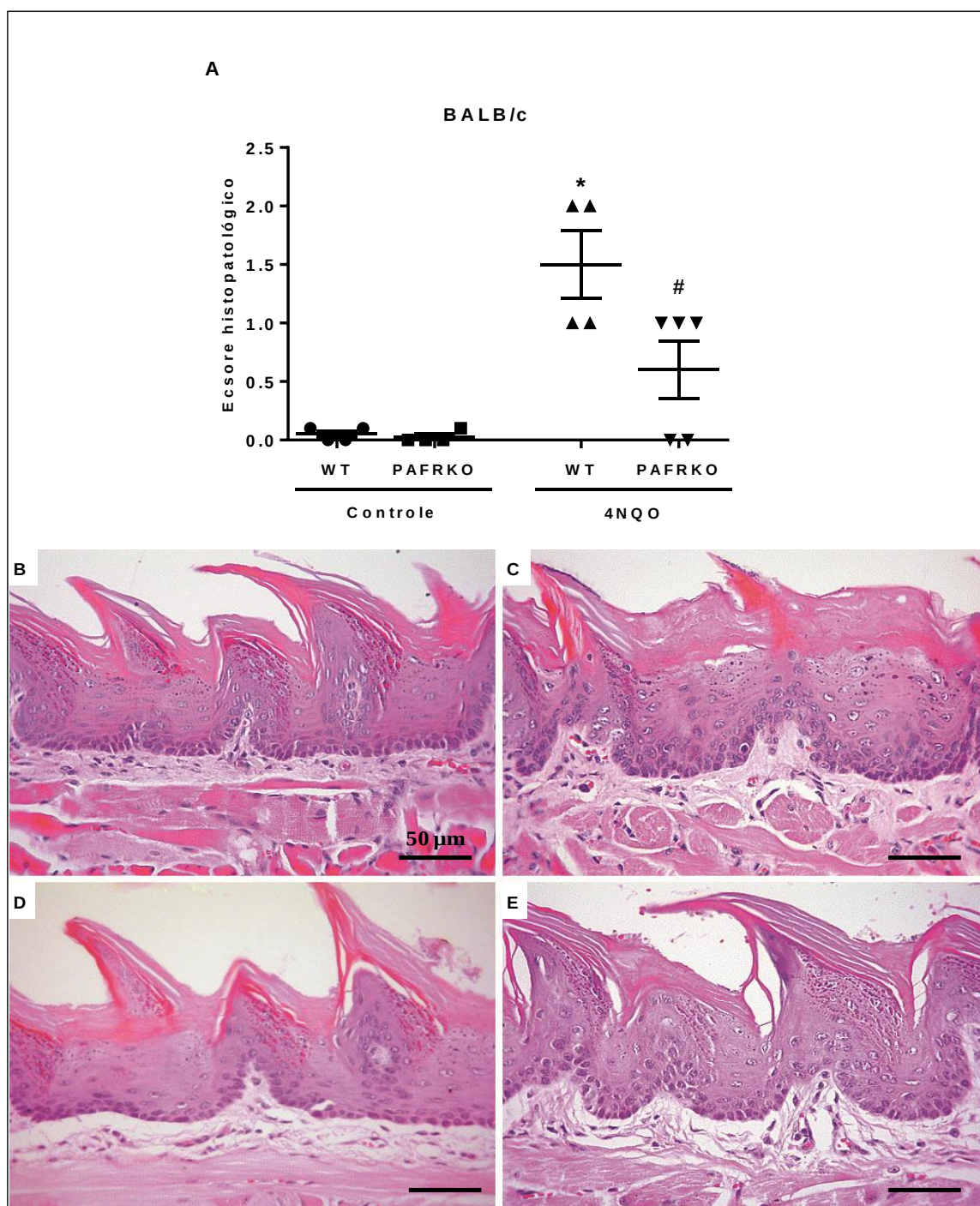


Figura 12. Escore histopatológico (A) e aspectos microscópicos representativos (B-E) das lesões em língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 μ g/ml) durante 28 semanas. B – BALB/c WT não tratado (controle). C – BALB/c WT tratado com 4NQO. D – PAFRKO não tratado com 4NQO. E - PAFRKO tratado com 4NQO. Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão.

Análise de proliferação celular

Os camundongos PAFRKO da linhagem C57BL/6 tratados com 4NQO apresentaram um aumento significativo de células suprabasais imunomarcadas pelo PCNA. Essa diferença estatística se manteve quando comparou-se os camundongos WT e PAFRKO ambos tratados com 4NQO (Figura 13).

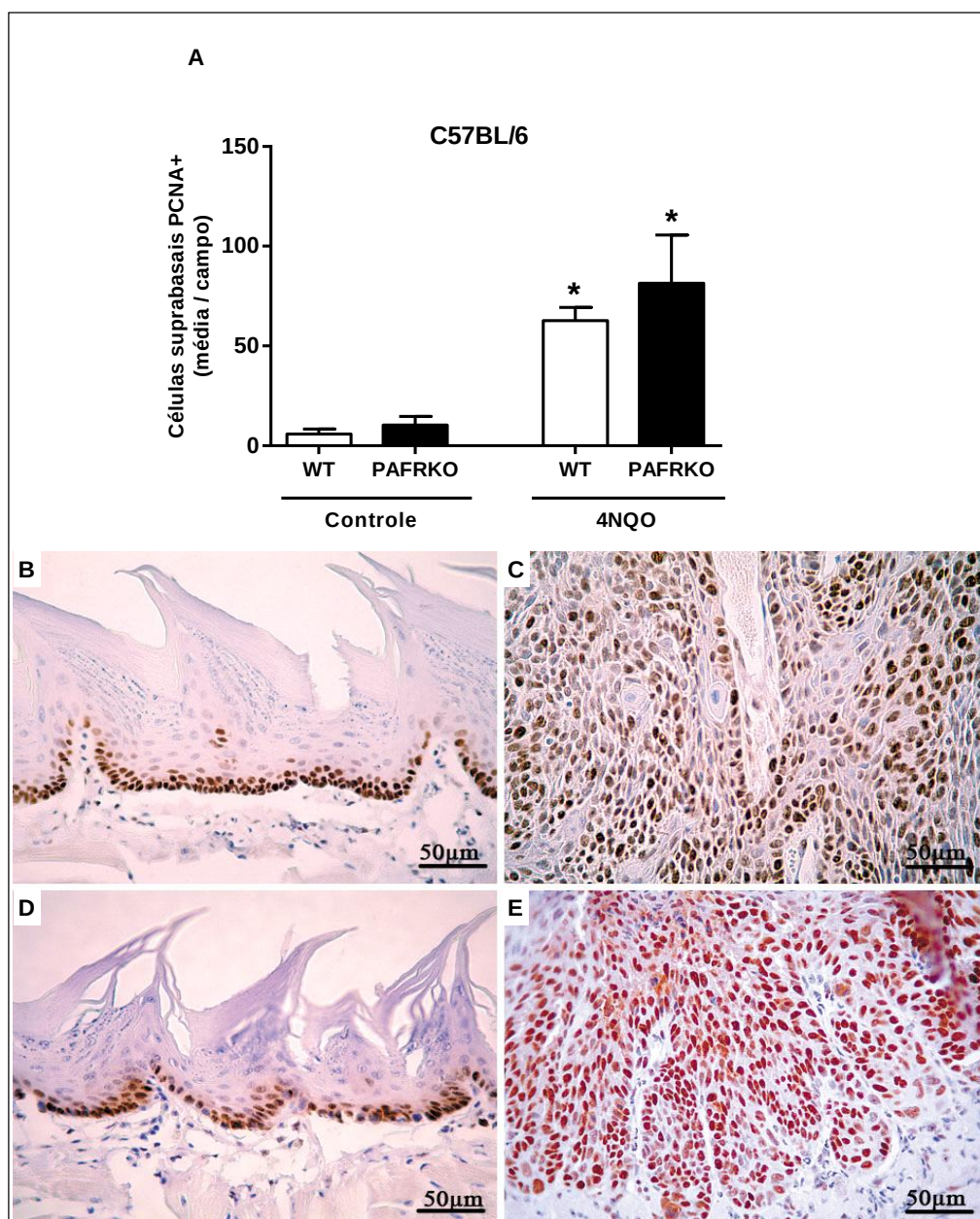


Figura 13. Expressão imunohistoquímica de células suprabasais PCNA positivas (A) e aspectos representativos das células imunomarcadas (B-E) presentes nas lesões de língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. B – WT C57BL/6 não tratado (controle). C – WT C57BL/6 tratado com 4NQO. D – PAFRKO não tratado (controle). E– PAFRKO tratado com 4NQO. Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle). Dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão.

Os camundongos WT e PAFRKO da linhagem BALB/c tratados com 4NQO não apresentaram alterações significativas no número de células suprabasais imunomarcadas pelo PCNA (Figura 14).

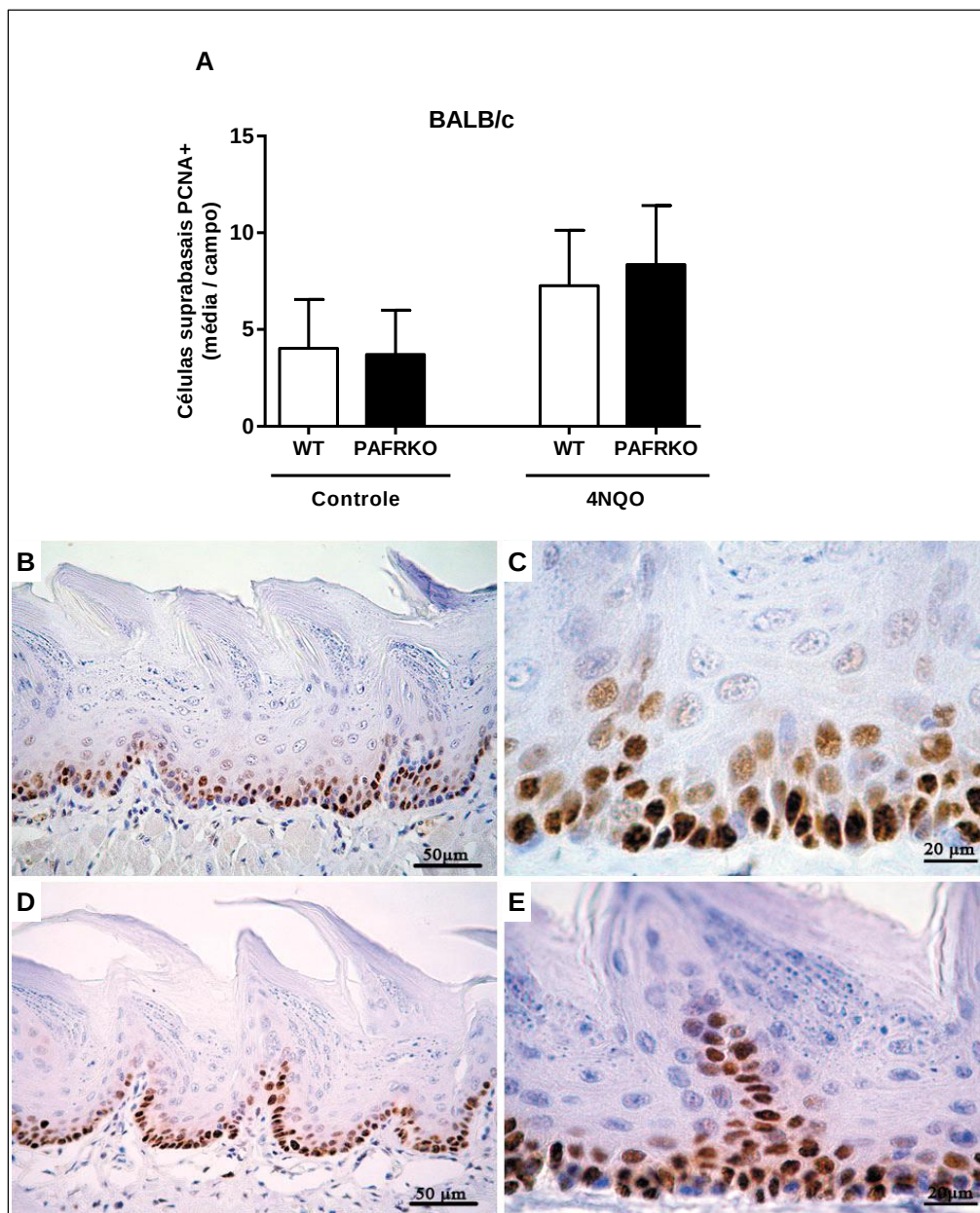


Figura 14. Expressão imunohistoquímica de células suprabasais PCNA positivas (A) e aspectos representativos das células imunomarcadas (B-E) presentes nas lesões de língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. B – BALB/c WT não tratado (controle). C – BALB/c WT tratado com 4NQO. D – PAFRKO não tratado (controle). E– PAFRKO tratado com 4NQO. Teste de Mann-Whitney. Dados foram expressos como mediana ± desvio padrão.

Análise do infiltrado inflamatório

Eosinófilos

Realizou-se a coloração pelo Sirius Red para identificação de eosinófilos nas lesões linguais. A figura 15 mostra a média de eosinófilos nas lesões em língua de camundongos. O tratamento com 4NQO durante 28 semanas induziu significativo aumento do número de eosinófilos presentes nas lesões de língua dos camundongos WT C57BL/6 em relação ao seu respectivo controle (sem tratamento), o que não pôde ser observado com os animais PAFRKO (Figura 15).

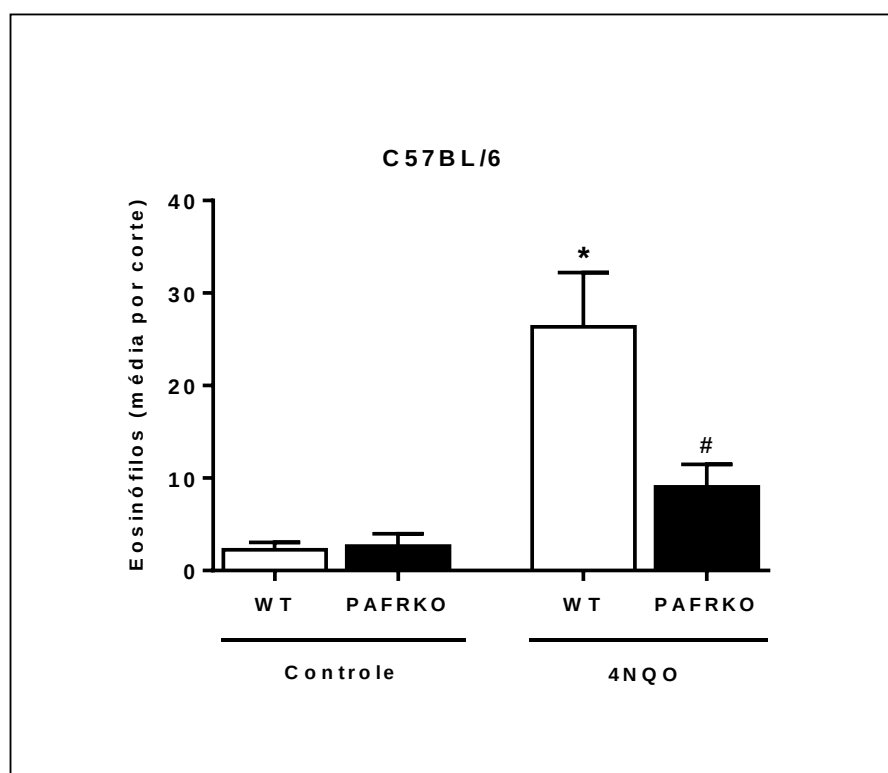


Figura 15. Contagem de eosinófilos em lesões de língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão.

Os camundongos WT da linhagem BALB/c tratados com 4NQO apresentaram aumento significativo do número de eosinófilos nas lesões de língua quando comparados ao respectivo controle. Por outro lado, o mesmo efeito não foi observado nos camundongos PAFRKO tratados com 4NQO (Figura 16).

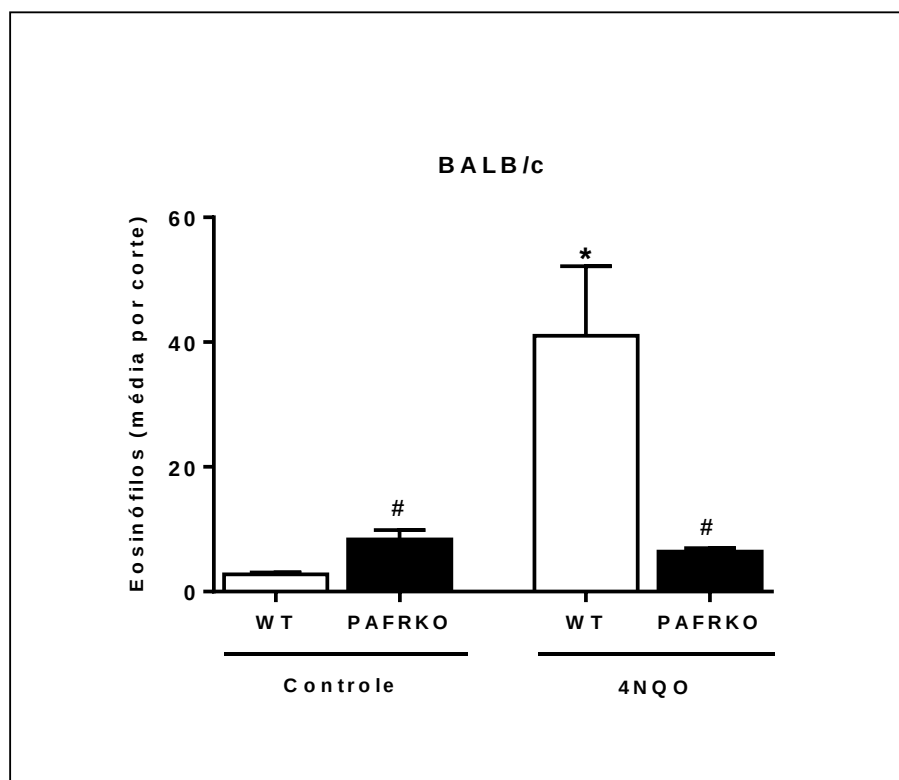


Figura 16. Contagem de eosinófilos em lesões de língua de camundongos BALB/c WT e PAFRKO tratados ou não com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão.

Neutrófilos

Foi realizado o ensaio para quantificação indireta da presença de neutrófilos nas lesões linguais, por meio da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Na figura 17 nota-se que o tratamento com carcinógeno não alterou a produção dessa enzima nas lesões em língua dos camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6. Observou-se, no entanto, que os camundongos PAFRKO tratados ou não tratados com 4NQO apresentaram maior atividade de MPO em língua quando comparados aos camundongos WT (Figura 17).

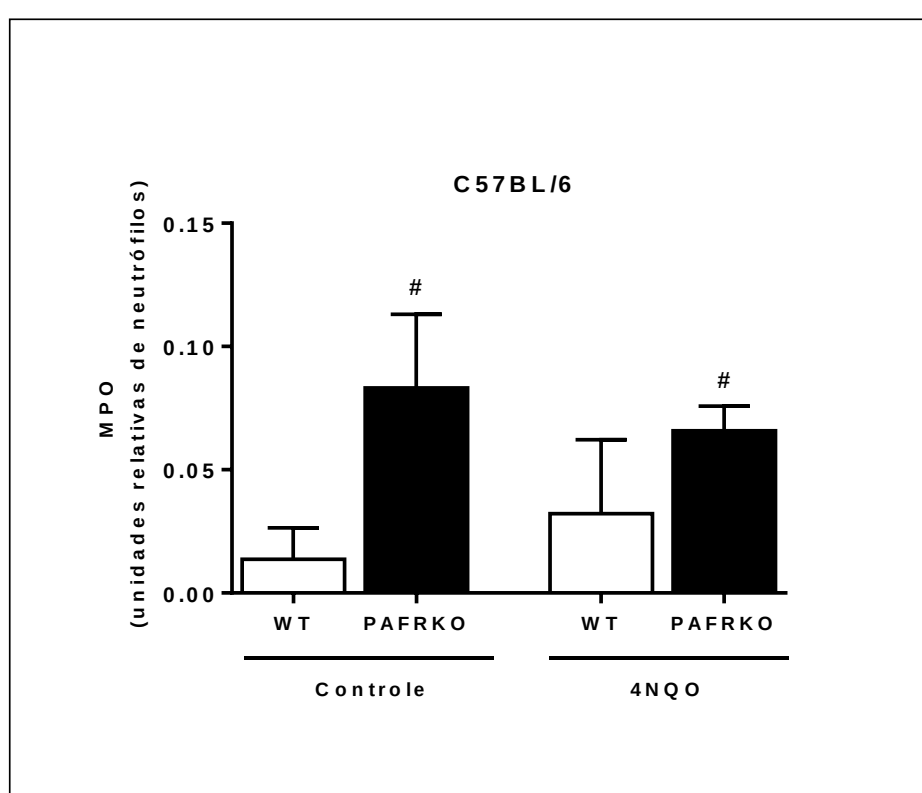


Figura 17. Atividade de mieloperoxidase (MPO) em língua de camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6 tratados e não tratados com 4NQO (50 µg/ml) durante 28 semanas. Teste t não paramétrico (# $p < 0,05$ quando comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão

Com relação à linhagem BALB/c, o tratamento com 4NQO não alterou a atividade desta enzima nas lesões de língua dos camundongos WT. Os camundongos PAFRKO não tratados com 4NQO apresentaram atividade enzimática de MPO significativamente menor quando comparada ao seu *background* também não tratado (Figura 18).

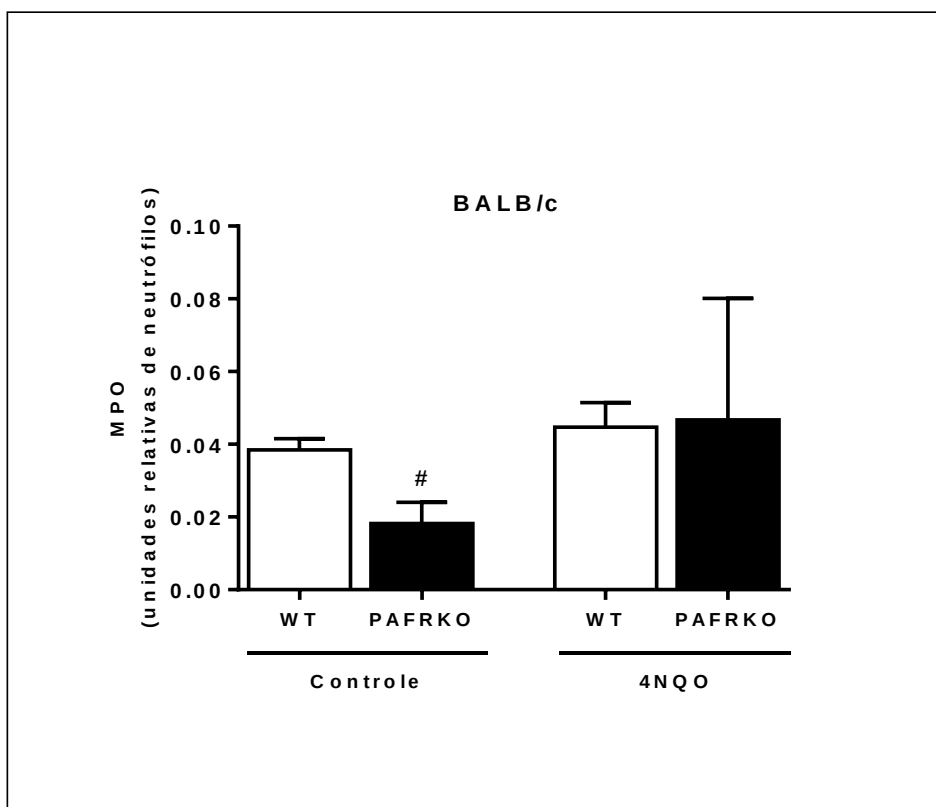


Figura 18. Atividade de mieloperoxidase (MPO) em língua de camundongo WT e PAFRKO da linhagem BALB/c tratados e não tratados com 4NQO (50µg/ml) durante 28 semanas. Teste t não paramétrico (# $p < 0,05$ comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Macrófagos

Foi realizado o ensaio imunoenzimático para detecção indireta de macrófagos presentes nas lesões em língua dos camundongos, por meio da quantificação da enzima n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG). Os camundongos PAFRKO controles apresentaram elevada quantidade de NAG em relação aos animais WT C57BL/6 também não tratados. O tratamento com 4NQO reduziu significativamente a atividade dessa enzima em língua de camundongos PAFRKO da linhagem C57BL/6 (Figura 19).

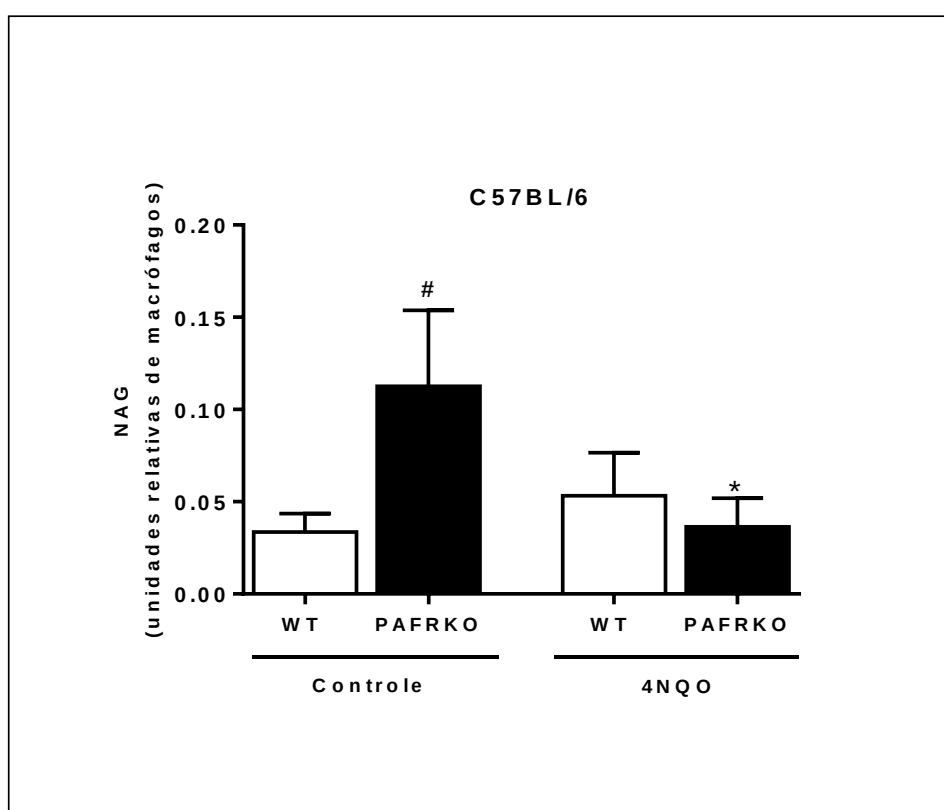


Figura 19. Atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) em lesões em língua de camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO tratados e não tratados com 4NQO (50 μ g/ml) durante 28 semanas. Teste t não paramétrico (* $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado ao WT do mesmo grupo). Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Análise da produção de citocinas

CCL4

O tratamento com 4NQO aumentou significativamente os níveis dessa quimiocina nos camundongos WT da linhagem C57BL/6. Para os camundongos PAFRKO de ambas as linhagens, estes níveis apresentaram-se reduzidos após o tratamento com 4NQO, porém de maneira significativa somente para a linhagem C57BL/6 (Figura 20).

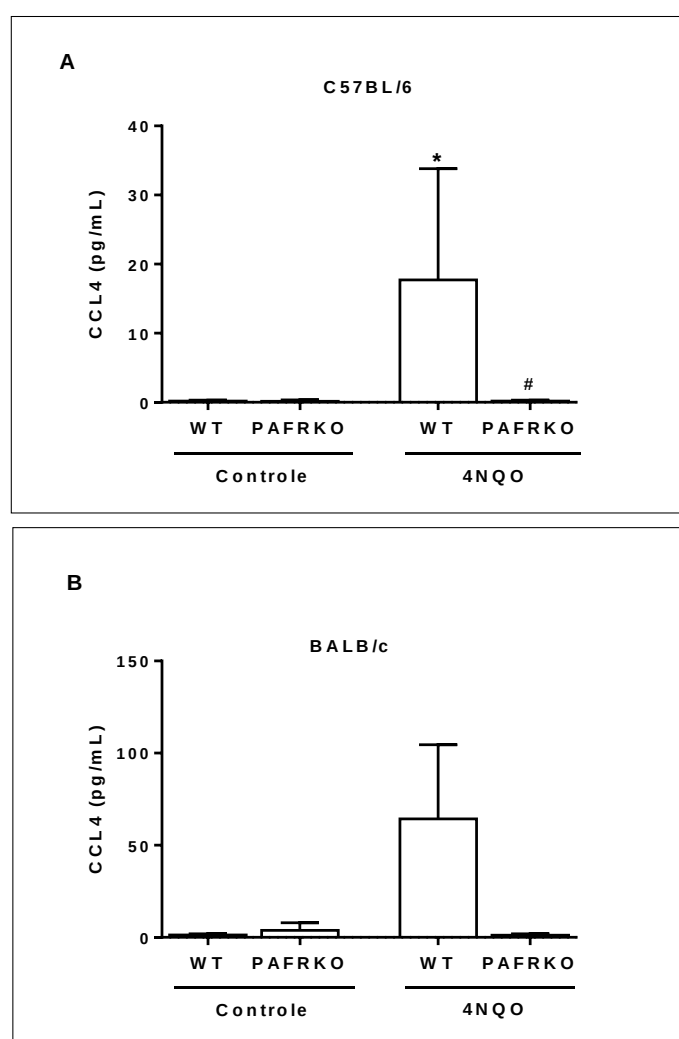


Figura 20. Produção de CCL4 no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 (A) e BALB/c (B) submetidos ao tratamento com 4NQO. As análises no soro foram realizadas por ELISA após 28 semanas de tratamento (* $p < 0,05$ comprado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado ao WT do mesmo grupo). Teste *one way* ANOVA. Pós-teste Newman-Keuls. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

CCL5

O tratamento com 4NQO reduziu significativamente os níveis da quimiocina CCL5 no soro dos camundongos PAFRKO da linhagem C57BL/6 (Figura 21 A). Com relação a linhagem BALB/c, o tratamento com 4NQO elevou os níveis séricos desta quimiocina nos camundongos PAFRKO (Figura 21 B).

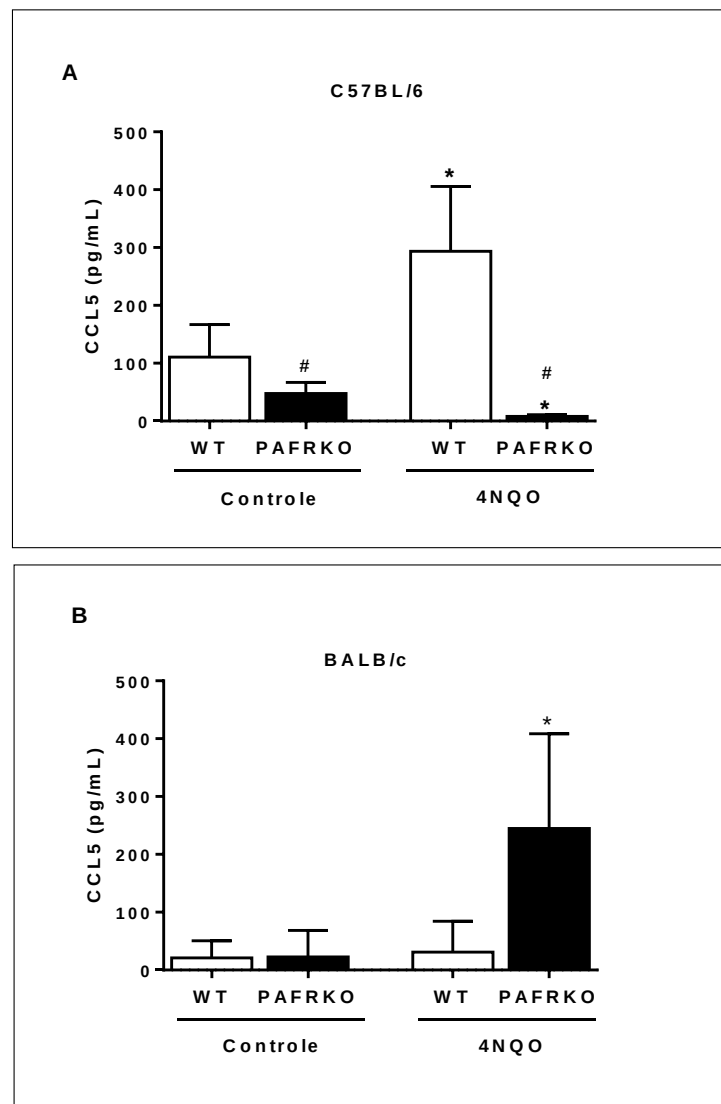


Figura 21. Produção de CCL5 no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 (A) e BALB/c (B) submetidos ao tratamento com 4NQO. As análises no soro foram realizadas por ELISA após 28 semanas de tratamento (* $p < 0,05$ comprado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado ao WT do mesmo grupo). Teste *one way* ANOVA. Pós-teste Newman-Keuls. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão

TNF- α

O tratamento com 4NQO reduziu de forma significativa a produção de TNF- α no soro dos camundongos WT da linhagem C57BL/6 (Figura 22 A) e BALB/c (Figura 22 B). Os camundongos PAFRKO das linhagens C57BL/6 e BALB/c não tratados com 4NQO apresentaram níveis reduzidos maiores desta citocina quando comparados aos animais WT também não tratados (Figura 22).

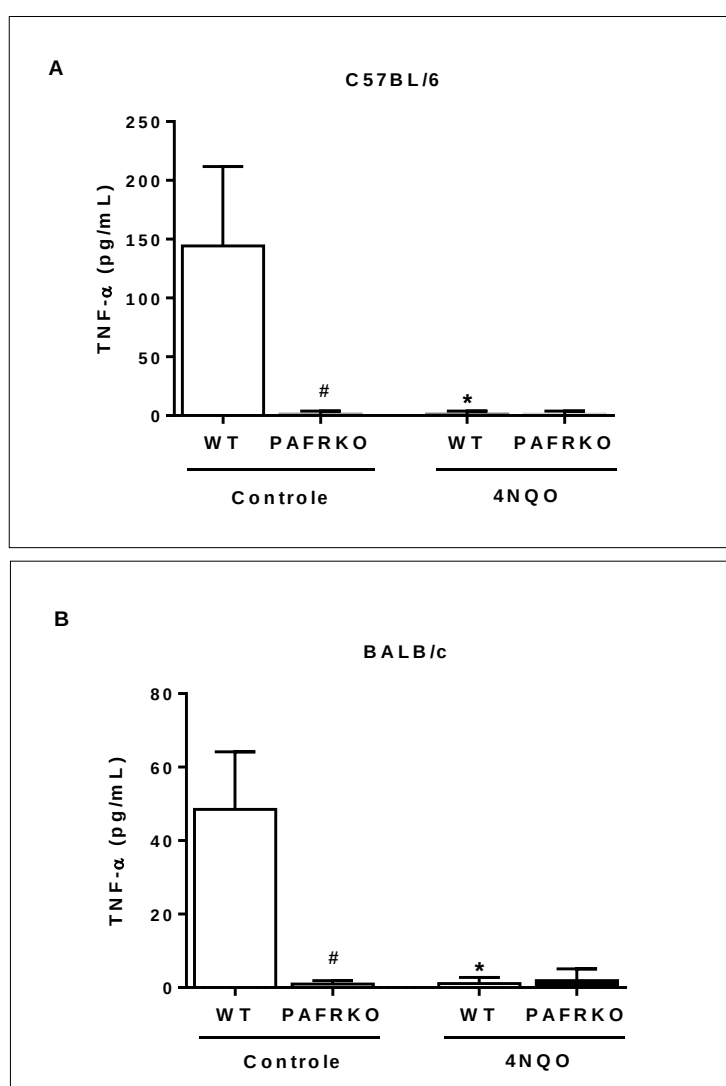


Figura 22. Produção de TNF- α no soro de animais WT e PAFRKO C57BL/6 (A) e BALB/c (B) submetidos ao tratamento com 4NQO. As análises no soro foram realizadas por ELISA após 28 semanas de tratamento (* $p < 0,05$ comprado ao respectivo controle; # $p < 0,05$ comparado ao WT do mesmo grupo). Teste *one way* ANOVA. Pós-teste Newman-Keuls. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão

Tabela 4. Sumário comparativo do resultado da carcinogênese entre as diferentes linhagens de camundongos PAFRKO tratados com 4NQO em relação às suas respectivas linhagens de camundongos WT tratados.

PAFRKO C57BL/6 tratado	PAFRKO BALB/c tratado
Lesões macroscópicas similares	Ausência de lesões macroscópicas
Escore histopatológico de displasia similar (CA invasivo)	Escore histopatológico de displasia similar (leve)
Proliferação celular similar	Proliferação celular similar
Diminuição do infiltrado eosinofílico	Diminuição do infiltrado eosinofílico
Aumento do infiltrado de neutrófilos	Sem alteração no infiltrado de neutrófilos
Sem alteração do infiltrado de macrófagos	Não analisado
<u>Níveis séricos de citocinas e quimiocinas:</u>	<u>Níveis séricos de citocinas e quimiocinas:</u>
CCL4 diminuiu	CCL4 inalterado
CCL5 diminuiu	CCL5 inalterado
TNF- α inalterado	TNF- α inalterado

Análise da expressão de marcadores relacionados a modificações no estroma e parênquima nas lesões epiteliais induzidas pelo 4NQO

Realizamos PCR em tempo real nas amostras das lesões em língua e verificamos que o tratamento com 4NQO induziu aumento significativo da expressão de lyso-PAF, produto intermediário da síntese do PAF, em camundongos C57BL/6 WT.

Camundongos WT C57BL/6 tratados com 4NQO durante 28 semanas apresentaram ainda aumento significativo na expressão dos fatores de crescimento EGF (fator de crescimento epitelial), FGF1 (fator de crescimento para fibroblastos 1), TGFB1 (fator transformador de crescimento 1), VEGFa (fator de crescimento de endotélio vascular a) e VEGFb (fator de crescimento de endotélio vascular b) (figura 23 A).

A expressão das citocinas IL-6 (Interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) também apresentou aumento significativo nos camundongos WT tratados com 4NQO. Para o grupo de enzimas analisadas, observou-se aumento significativo das enzimas metaloproteínase 1 (MMP-1), metaloproteínase 2 (MMP-2), metaloproteínase 9 (MMP-9) e inibidor tecidual de metaloproteínase 1 (TIMP-1) após o tratamento com 4NQO. Com relação aos componentes de matriz extracelular, observou-se que o tratamento com 4NQO induziu aumento significativo de ITGA4 (integrina alfa 4), VTN (vitronectina) e COL1A1 (colágeno 1 alfa 1) nos camundongos WT tratados com 4NQO (Figura 23 A).

Quando foram comparados os camundongos WT e PAFRKO da linhagem C57BL/6 tratados com 4NQO, verificou-se que os animais PAFRKO exibiram aumento significativo na expressão dos fatores de crescimento (VEGFa, VEGFb), de citocinas (IL-1b, IL-6, IL-17 e TNF- α), de enzimas (MMP-1a, MMP-2, MMP-9 e TIMP-1) e de componente da matriz extracelular (ITGA4, VTN, COL1A1) (Figura 23 B).

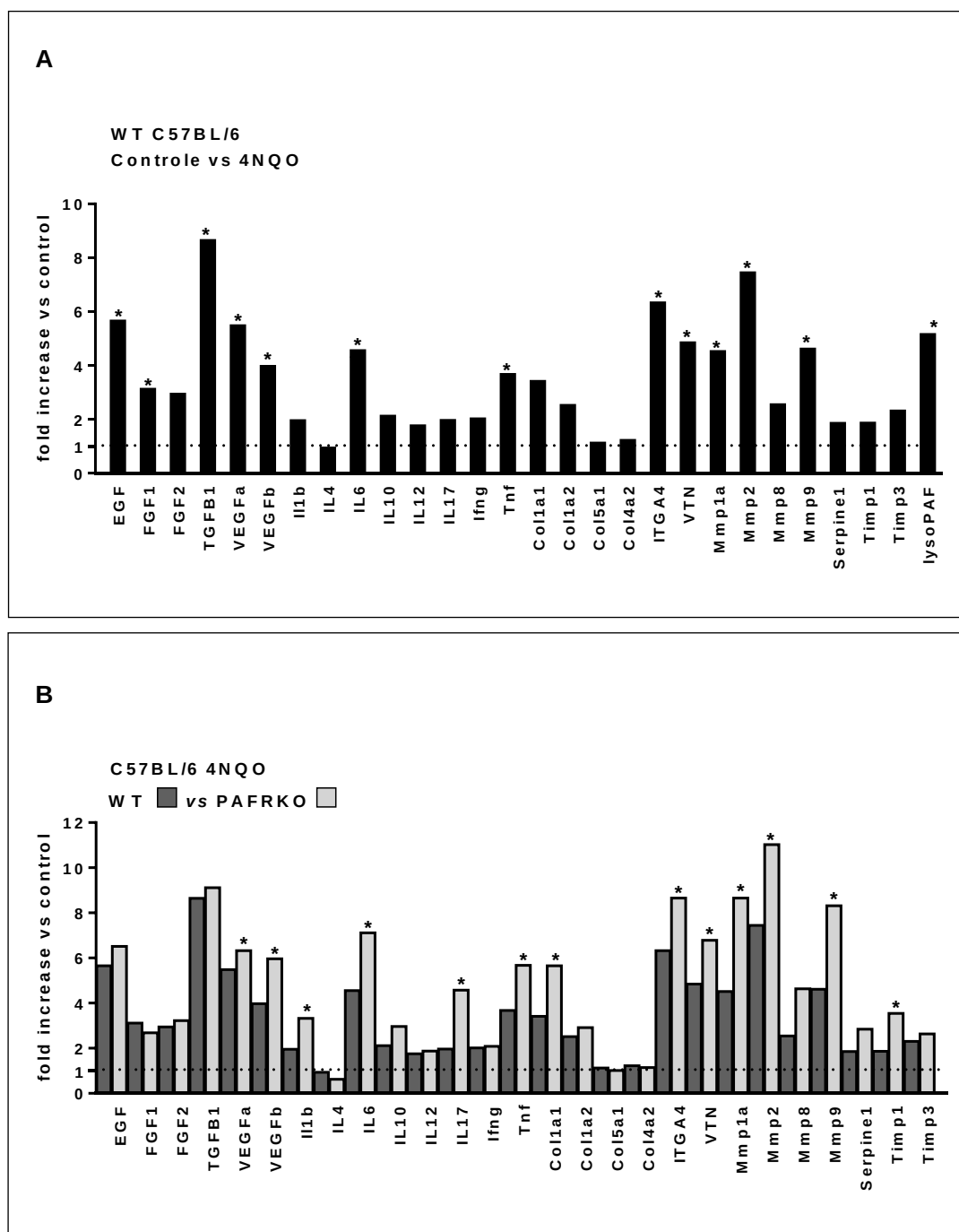


Figura 23. Expressão de marcadores relacionados a alterações no estroma e parênquima em lesões epiteliais induzidas pelo 4NQO. Análise por PCR em tempo real (SABiosciences – Qiagen), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “WoundHealing” (PAMM-121) e “*Inflammatory cytokines and receptors*” (PAMM-011) para citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios. Resultados expressos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir *fold increase* em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos GAPDH e HPRT o método limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizada pelas amostras controle. (A) Resultados representam expressão relativa do grupo WT C57BL/6 tratado em relação aos controles não tratados. (B) Indica, a expressão relativa do grupo WT C57BL/6 tratado em relação ao grupo PAFRKO tratado. * $p < 0,05$, Mann-Whitney com correção de Benjamini e Hochberg.

Ensaio *in vitro* – Invasão celular

Realizou-se o ensaio de invasão celular com as linhagens HN12 e HN13 *in vitro*. Para esse ensaio utilizou-se o antagonista do receptor de PAF (UK-74,505) na concentração 10^{-7} M durante 45 minutos antes do ensaio propriamente dito. Como quimioatraente celular utilizou-se a CCL3 na concentração 10 ng/ml, pois ensaios prévios demonstraram que essa quimiocina apresenta efeito quimioatrativo similar ao meio de cultura com soro fetal bovino, geralmente empregado como controle positivo. O meio de cultura sem CCL3 foi utilizado como controle negativo do ensaio. Como podemos observar na figura 24 abaixo, o antagonista UK-74,505 na concentração 10^{-7} M exerceu um efeito inibitório significativo na invasividade celular quando se utilizou a linhagem celular HN12 (metastática). Entretanto, quando se utilizou a linhagem celular HN13 (não metastática) observou-se redução da invasão celular, mas sem diferença estatística (Figura 25).

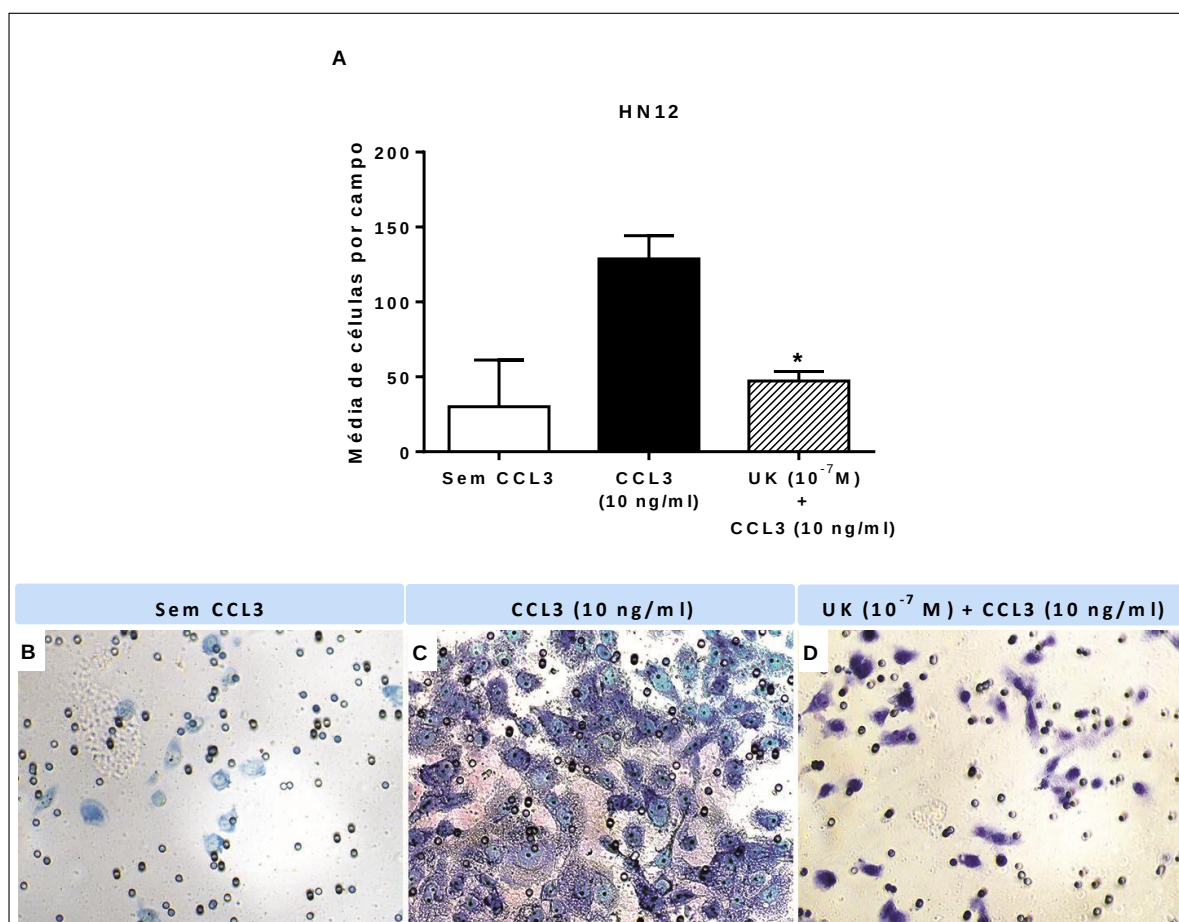


Figura 24. Efeito do antagonista de PAF (UK-74,505) na capacidade de invasão da linhagem HN12 induzida por CCL3 *in vitro*. A - Média de células por campo; B – Sem CCL3; C – Com CCL3 (10 ng/ml) e D – UK-74,505 na concentração 10^{-7} M associado a CCL3 (10 ng/ml). Teste t não paramétrico (* $p < 0,05$ comparado ao grupo com CCL3). Aumento 200 vezes. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

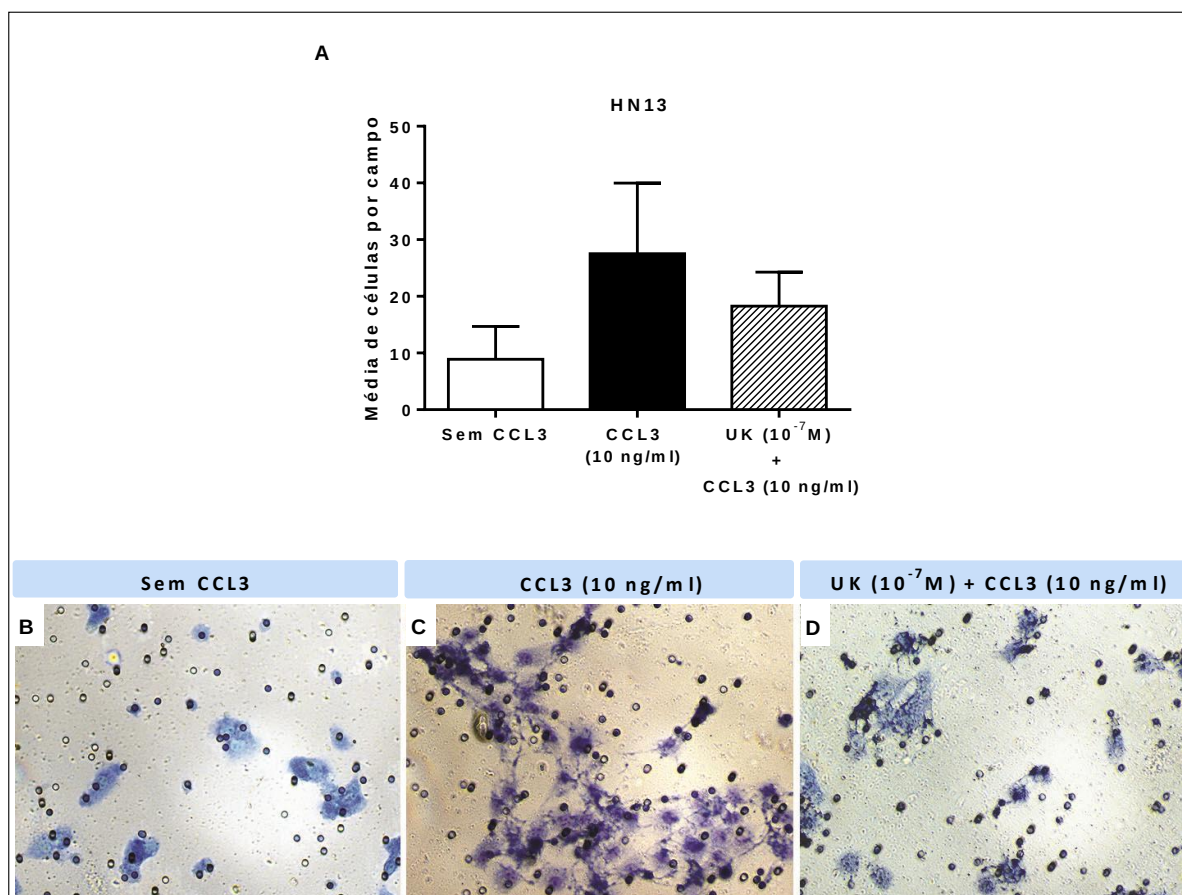
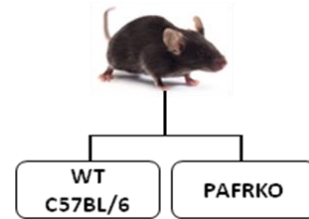


Figura 25. Efeito do antagonista de PAF (UK-74,505) na capacidade de invasão da linhagem HN13 induzida por CCL3 *in vitro*. A – Média de células por campo; B – Sem CCL3 (10 ng/ml); C – Com CCL3 (10 ng/ml) e D – UK-74,505 na concentração 10^{-7} M associado a CCL3 (10 ng/ml). Teste t não paramétrico (* $p < 0,05$ comparado ao grupo com CCL3). Aumento de 200 vezes. Dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

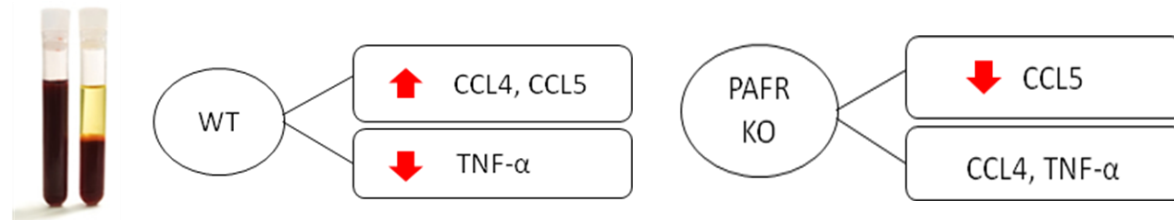
Sumário dos principais resultados

In vivo



- Ocorrência, número e tamanho das lesões em língua;
 - Histopatologia;
 - Proliferação celular.
- SEM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS

WT C57BL/6 tratado com 4NQO
↑ de lyso-PAF



In vitro

Antagonista do receptor de PAF (UK-74,505) ↓ invasão HN12.

DISCUSSÃO

O fator de agregação plaquetária (PAF, 1-*O*-hexadecyl-2-acetoylsn-glycero-3-phosphocholine) é um mediador inflamatório lipídico gerado via acetilação enzimática do precursor 1-*O*-hexadecyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lysoPAF). A bioatividade de PAF é regulada por enzimas denominadas PAF hidrolases, as quais convertem PAF de volta a lyso-PAF. Desta forma, o PAF não é armazenado nas células e sim rapidamente gerado via acetilação enzimática (ISHII et al., 2002; WELCH et al., 2009; YU et al., 2014). O PAF foi inicialmente identificado como um fator produzido por basófilos e com propriedades em induzir a agregação de plaquetas e anafilaxia (BENVENISTE; HENSON; COCHRANE, 1972). Posteriormente, identificou-se que PAF participa no recrutamento leucocitário em diversos tipos de doenças e condições inflamatórias, como por exemplo, anafilaxia, cânceres de mama, cólon, de pele e melanoma (APONTE et al., 2008; BACHI et al., 2012; CHEN et al., 2015; DENIZOT et al., 2005; DENIZOT et al., 2001; SAHU et al., 2012; VADAS et al., 2008). A literatura tem relacionado a atuação de PAF na carcinogênese devido à sua capacidade de, após se ligar ao seu receptor (PAFR), ativar cascatas de sinalização intracelular que culminam no aumento da transcrição de fatores oncogênicos como c-myc e survivina (CHEN et al., 2015). Além disto PAF atua estimulando a liberação de fatores angiogênicos o que possibilita o crescimento e nutrição tumorais (BUSSOLATI et al., 2000).

Apesar de estudos relacionando PAF/ PAFR em diferentes tipos de cânceres e os prováveis mecanismos associados, não existem trabalhos disponíveis sobre o papel deste eixo no carcinoma de boca. Desta forma, no presente trabalho, o papel de PAF foi investigado em modelo de carcinogênese bucal experimental. Inicialmente verificamos que o tratamento com carcinógeno químico 4NQO induziu aumento da expressão de lyso-PAF, um precursor inativo e metabólito de PAF, nas lesões linguais. De forma distinta, os níveis de lyso-PAF em amostras de carcinoma hepatocelular e de tireóide foram similares aos níveis encontrados em tecidos não tumorais utilizados como controle (DENIZOT et al., 2005; MATHONNET et al., 2006). Entretanto, o aumento de PAF e de outras moléculas envolvidas diretamente no seu metabolismo (PAF-AH, PLA₂) foram identificados em modelos de câncer de mama (MONTRUCCHIO et al., 1998) e de esôfago (CHEN et al., 2015) e no soro de pacientes com câncer colorretal (DENIZOT et al., 2004).

Esta observação inicial do aumento de lyso-PAF associado à carcinogênese bucal poderia ser um indicativo do papel de PAF neste processo. Utilizamos então duas estratégias experimentais para avaliação do possível papel de PAF 1) Ensaios *in vitro* utilizando células

de linhagem de carcinoma bucal e 2) Indução do modelo de carcinogênese bucal em animais deficientes de PAFR.

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas as linhagens HN12 (metastática) e HN13 (não metastática) obtidas de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) humano. Estas foram estimuladas com CCL3, uma quimiocina da família CC, previamente identificada como fator quimiotático para células neoplásicas de ovário (MOYANO CARDABA et al., 2012) e potencialmente implicada no processo de espalhamento tumoral do CCEB (SILVA et al., 2007). Previamente ao estímulo com CCL3, as células foram tratadas com UK-74,505 (antagonista do receptor de PAF de longa duração e alta especificidade utilizado previamente em estudos *in vivo*) (ALABASTER et al., 1991; PARRY et al., 1994). Verificamos que a inibição do receptor de PAF reduziu a invasão celular *in vitro* em ambas as linhagens, porém essa redução foi significativa somente quando utilizou-se a linhagem metastática (HN12). Na literatura, efeito similar do tratamento com antagonista de PAFR foi já demonstrado em modelo *in vivo* de metástase pulmonar do melanoma. Neste estudo, IM et al. (1996), observaram que a injeção de PAF sintético aumentou a metástase pulmonar de células de melanoma. Este efeito foi revertido quando se utilizou um antagonista do receptor de PAF (BN50739)

Com base nos achados *in vitro*, avaliamos em modelo experimental o efeito do carcinógeno químico 4NQO no desenvolvimento de lesões linguais. Conforme previamente descrito pelo nosso grupo (SILVA et al., 2014) e outros (LU et al., 2006; TANG et al., 2004), o tratamento por 28 semanas resulta na formação de lesões linguais. TANG et al. (2004) estudando comparativamente a incidência de tumores em camundongos que receberam o 4NQO diluído em água ou pincelado na língua, verificaram que ao final do experimento de 28 semanas, 100% dos animais que receberam a droga diluída em água desenvolveram tumores, enquanto apenas 5% desenvolveram tumores quando a técnica de pincelamento foi empregada. De forma similar, neste estudo observamos ocorrência de lesões com elevados escores histopatológicos variando entre carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo nos camundongos WT C57BL/6 tratados quando comparados aos camundongos não tratados. Observamos ainda que o tratamento com 4NQO resulta na formação de lesões linguais macroscopicamente maiores e mais numerosas além do aumento da proliferação celular na camada suprabasal, do infiltrado eosinofílico lesional e níveis séricos de CCL4 e CCL5 em relação aos camundongos WT não tratados. O tratamento com 4NQO também elevou os

níveis moleculares de citocinas, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e mediadores inflamatórios nos camundongos WT tratados.

Avaliamos em seguida a resposta de animais PAFR *knockout* ao tratamento com carcinógeno químico. Segundo ISHII et al. (2002), a produção de PAF pelos neutrófilos destes animais transgênicos permanece inalterada e a ausência do seu receptor é observada nas células do tecido pulmonar, nos macrófagos e nos neutrófilos do hospedeiro, resultando em inatividade da molécula. Observamos que a ausência do receptor de PAF nos camundongos de *background* genético C57BL/6 tratados com 4NQO não resultou em modificações significativas da carcinogênese nas condições estudadas considerando como parâmetros número e área das lesões, gradação histológica da displasia epitelial e proliferação celular. De forma similar, em modelo de câncer de cólon utilizando camundongos PAFRKO não apresentaram diferença no volume tumoral em relação aos animais selvagens (FERREIRA et al., 2007). Entretanto, em modelo de tumor de Erlich, observou-se que a deleção do PAFR resultou em significativa redução de lesões tumorais (FERREIRA et al., 2007).

Apesar da similaridade da progressão neoplásica entre os camundongos WT C57BL/6 e PAFRKO, foram detectados parâmetros inflamatórios alterados nos camundongos PAFR *knockout* tratados com 4NQO. Dentre estes, redução de eosinófilos nos sítios lesionais e redução sérica de CCL5 e CCL4. O papel da inflamação na carcinogênese permanece controverso, podendo apresentar efeitos pró ou anti-tumorais (MANTOVANI et al., 2008). Os eosinófilos, sendo um dos componentes deste controverso processo inflamatório, tem demonstrado papel ambíguo na carcinogênese (MARTINELLI-KLAY; MENDIS; LOMBARDI, 2009). ERCAN et al. (2005) demonstraram haver menor número de eosinófilos em CCE de laringe em estágios avançados. A alta incidência de fibrossarcoma em camundongos transgênicos foi favorecida pela ausência de eosinófilos segundo estudo conduzido por SIMSON et al. (2007). Estes trabalhos demonstram o papel dos eosinófilos em restringir à progressão neoplásica. Entretanto, a hipótese da atividade favorável à progressão neoplásica desempenhada por estes leucócitos é corroborada em trabalhos que demonstraram aumento de eosinófilos em amostras de CCE de boca e de laringe invasivos (SAID et al., 2005; TOSTES OLIVEIRA et al., 2009). De forma interessante, nos camundongos PAFRKO da linhagem BALB/c observamos que o tratamento com 4NQO reduziu o número de eosinófilos. Este dado está de acordo com as linhas de estudo que associam a progressão neoplásica à diminuição de eosinófilos na região do tumor. Verificamos previamente neste

modelo que a redução local de eosinófilos (utilizando animais BALB/c GATA^{-/-}, ou seja, animais deficientes da região promotora do gene que codifica a linhagem mielóide de eosinófilos) resultou em menor formação de lesões linguais, com menor escore histopatológico e proliferação celular (DA SILVA et al., 2014). Os eosinófilos podem liberar diversas substâncias como PAF, EPO (eosinophil peroxidase), TNF- α , TGF- β e CCL5 (MARTINELLI-KLAY et al., 2009). A quimiocinas CCL5 exerce sua atividade após se ligar a um de seus receptores – CCR1, CCR3 e CCR5 - os quais são expressos por diversas células dentre as quais se incluem os eosinófilos (ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2013). Perante o exposto, as condições tanto de redução do nível sérico de CCL5 quanto de eosinófilos nas lesões linguais dos camundongos PAFRKO observadas neste trabalho, podem estar associadas. Continuando no âmbito das quimiocinas, a redução sérica de CCL4 nos camundongos PAFRKO tratados também pode ter influenciado a redução de eosinófilos em lesões de língua, uma vez que esta quimiocina se liga também ao receptor CCR5 (ROSENBERG et al., 2013). O PAF é um mediador inflamatório que atua no recrutamento de eosinófilos, os quais possuem receptor para a atividade desta molécula (PAFR). Dessa maneira, pode-se associar o observado aumento da transcrição de lyso-PAF ao aumento populacional de eosinófilos nas lesões linguais dos camundongos WT C57BL/6 tratados. O aumento sérico de CCL4 e CCL5 observado nestes camundongos pode justificar e ser justificado pelo aumento de eosinófilos, como previamente exposto na discussão sobre a relação do número de eosinófilos e estas quimiocinas nos camundongos PAFRKO tratados com 4NQO. Corroborando com nossos achados, ISHIURA et al. (2005) demonstraram acúmulo de eosinófilos no sistema respiratório induzido por PAF. DYER et al. (2010) demonstraram correlação positiva e dose-dependente entre degranulação de eosinófilos murinos tratados com antagonista de PAFR ou com deleção deste receptor e a presença de PAF ou lyso-PAF. O aumento de eosinófilos observado nas lesões de língua dos camundongos WT C57BL/6 pode ainda ser correlacionado ao aumento da transcrição de TGF- β 1, uma vez que os eosinófilos representam a maior fonte da biosíntese deste fator (DAVIS; ROTHENBERG, 2014). Este fator atua estimulando a progressão tumoral, a invasão e a transição epitélio-mesênquima (EMT) da células neoplásicas em estágios tardios do desenvolvimento tumoral (ROBERTS; WAKEFIELD, 2003; ZHONG et al., 2011).

Por outro lado, os animais PAFRKO tratados apresentaram aumento da transcrição de moléculas inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e IL-17 nas lesões linguais, em comparação aos animais WT C57BL/6 tratados. De forma similar, LEE et al. (2015) demonstraram aumento do IL-1 β

em lesões linguais de camundongos WT tratados com 4NQO e arecoline. A IL-6 é uma das principais citocinas implicadas na inflamação associada à carcinogênese, aumentando o crescimento tumoral (HONG, D. S.; ANGELO; KURZROCK, 2007; NAUGLER; KARIN, 2008). O aumento da transcrição de IL-6 neste modelo também pode ser um indicativo de maior crescimento tumoral. HWANG et al. (2012) demonstraram níveis elevados de IL-6 em estágios tardios do CCEB e sua associação com a invasão óssea. Outra citocina envolvida no crescimento tumoral e com transcrição elevada no nosso estudo foi a IL-17. Segundo ZHANG et al. (2009) o envolvimento desta citocina no crescimento tumoral está relacionado à sua capacidade de estimular a angiogênese em pacientes com carcinoma hepatocelular. Por outro lado, a IL-17 tem sido descrita como apresentando atividade anti-tumoral em portadores de câncer de ovário (KRYCZEK et al., 2009) e sugerida como fator de prognóstico favorável à sobrevida de indivíduos com câncer de esôfago (LV et al., 2011).

Verificamos ainda que os animais deficientes do receptor PAF tratados com carcinógeno apresentaram aumento da transcrição das enzimas MMP-1, MMP-2, MMP-9 e TIMP-1, dos fatores de crescimento (VEGFa e VEGFb), da citocina TNF- α , e das proteínas de matriz Col1a1, ITGA4 e VTN. Observamos aumento da transcrição de TNF- α nas lesões linguais dos camundongos PAFRKO em relação aos camundongos WT C57BL/6 tratados. A propriedade angiogênica de TNF- α se caracteriza por ser indireta, uma vez ela apresenta capacidade de induzir diversas células a produzirem fatores angiogênicos propriamente dito (KOLLIAS et al., 1999). Em condições de malignidade esta característica se mantém e onde elevadas concentrações locais de TNF- α produzida cronicamente atuam como promotor tumoral endógeno (LEJEUNE; RUEGG; LIENARD, 1998). Outra evidência de sua importante participação na tumorigênese é a resistência ao desenvolvimento de câncer de pele induzido em camundongos *knockouts* para TNF (MOORE et al., 1999). Em humanos, o aumento da transcrição de TNF- α foi observada em amostras de câncer de ovário por (NAYLOR et al., 1993). Com relação ao câncer de boca PIVA et al. (2013) demonstraram altas concentrações de TNF- α no estroma tumoral de amostras de CCEB. Entretanto, SKRINJAR et al. (2015) demonstraram que os níveis séricos de TNF- α em pacientes com CCEB não apresentou correlação com a sobrevida e eram similares aos níveis observados em pacientes saudáveis. As metaloproteinases são proteases com capacidade de degradar componentes da matriz extracelular. Elas são subdivididas em grupos segundo sua especificidade proteolítica e são comumente expressas em neoplasias invasivas e no seu estroma adjacente (DE VICENTE et al., 2005). A metaloproteinase 1 (MMP-1) pertence ao

grupo das collagenases e as metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) pertencem ao grupo das gelatinases (BARROS et al., 2011; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003). Além de apresentarem papel fisiológico como, por exemplo, no desenvolvimento embrionário, a atividade das MMPs tem sido destacada em condições de desequilíbrio como no câncer (KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003). O desenvolvimento dos carcinomas ocorre na extensão epitelial confinado à membrana basal. Esta por sua vez, é composta por diferentes constituintes (colágeno tipo IV, laminina, heparan-sulfato, etc.) os quais devem ser degradados para que ocorra a progressão de carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo. Para tal, as células neoplásicas atravessam a membrana basal para posteriormente migrar em direção ao estroma. Desta maneira, enzimas proteolíticas apresentam papel crucial na invasão e metástase tumoral. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresentam atividade proteolítica sobre colágeno tipo IV, constituinte da membrana basal. A collagenase MMP-1 degrada principalmente colágeno tipo III, um dos principais constituintes da matriz extracelular intersticial. Sendo assim, podemos inferir que a atividade conjunta destas metaloproteinases, cuja transcrição apresentou-se elevada nas lesões de língua dos camundongos PAFRKO tratados, resultou no caráter predominantemente invasivo das lesões encontradas neste trabalho. Apesar da similaridade microscópica das lesões, deve-se considerar que a avaliação ocorreu em apenas um momento (28 semanas). Podemos então hipotetizar que a progressão das lesões no PAFRKO poderia ser diferente caso outros *time-points* fossem analisados. Altas concentrações de MMP-1 em neoplasias epiteliais e a sua superexpressão tem sido associada à invasividade tumoral e à metástase (BARROS et al., 2011; WESTERMARCK; KAHARI, 1999) como demonstrado por Cao et al (2009) em CCE de língua. HONG et al. (2000) e KUSUKAWA et al. (1993) demonstraram que as metaloproteinases 2 e 9 estavam correlacionadas à metástase linfonodal do CCEB, reforçando o papel das MMPs na invasão tumoral. Entretanto, como observado em outros componentes inflamatórios, há estudos contrapondo-se ao papel pró-tumoral das MMPs. Por exemplo, RIEDEL et al. (2000) demonstraram que os níveis de MMP-9 não se correlacionou ao estágio tumoral e à metástase linfonodal em tumores de laringe, orofaringe e hipofaringe. A atividade das metaloproteinases é modulada por inibidores naturais, as TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinase). Existem quatro isoformas de TIMP (1, 2, 3 e 4) sendo que cada uma apresenta atividade regulatória preferencial para algumas MMPs. Por exemplo, a TIMP-1 – cuja transcrição encontrou-se elevada nas lesões linguais dos camundongos PAFRKO tratados – exerce sua atividade preferencialmente sobre pró-MMP-9 (KERKELA; SAARIALHO-

KERE, 2003). Apesar de algumas atividades de TIMP, como inibição de angiogênese e indução de apoptose, serem descritas como propriedades anti-tumorais (WEIDNER, 1995), o aumento de TIMP-1 foi detectado em casos de CCEB metastáticos (KURAHARA et al., 1999).

Com relação aos fatores de crescimento, o VEGF se caracteriza por ser um dos principais fatores implicados na angiogênese tumoral (AGGARWAL et al., 2014). Nossos achados demonstraram transcrição aumentada de VEGFa e VEGFb nas lesões linguais dos camundongos PAFRKO em relação aos WT C57BL/6 tratados. Estes fatores são considerados primariamente angiogênicos (TISCHER et al., 1991) e comumente encontrados em tumores humanos (ROSKOSKI, 2007). A expressão aumentada de VEGF foi já descrita em estudos de CCE de boca e laringe e correlacionada ao pior prognóstico, menor sobrevida e ocorrência de metástase linfonodal (KO et al., 2015; NEUCHRIST et al., 1999; ZHAO et al., 2013). O aumento da transcrição de VEGFa e VEGFb nas lesões de língua dos camundongos PAFRKO ao aumento da transcrição de IL-1 β e de infiltrado de neutrófilos na língua destes animais, uma vez que a regulação genética de VEGF é realizada por diversos fatores dentre os quais IL-1 β e ROS (espécies reativas de oxigênio), sendo que este último apresenta neutrófilos como uma de suas principais fontes (FERRARA, 1999; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; LEE et al., 2015). VEGF, por sua vez, induz aumento de MMP-9 além de ser implicado no recrutamento leucocitário para o microambiente tumoral (HANSEN, 2013; HOEBEN et al., 2004). Sendo assim, podemos relacionar o aumento de neutrófilos na língua dos camundongos PAFRKO tratados ao aumento da transcrição de MMP-9 que por sua vez se relaciona ao aumento de VEGFa e VEGFb observados nas lesões linguais no nosso trabalho.

Com relação às proteínas de matriz, observou-se aumento da transcrição de ITGA4 (integrina alfa 4), VTN (vitronectina) e COL1A1 (colágeno tipo I alfa 1) nas lesões linguais do camundongos PAFRKO tratados. As proteínas da família das integrinas, como ITGA4 e VTN, estão envolvidas nas diversas etapas requeridas para o processo metastático (YOUNG et al., 2015). O papel de ITGA4 na carcinogênese ainda é controverso e depende do nível de expressão, do ambiente celular e estágio tumoral (HOLZMANN; GOSSLAR; BITTNER, 1998). Expressões elevada de VTN estão associadas à formação tumoral e metástase em modelos de câncer de ovário (HEYMAN et al., 2008; HEYMAN et al., 2010). Com relação aos cânceres de cabeça e pescoço, CHEN et al. (2011) demonstraram aumento da transcrição de VTN em lesões cancerizáveis induzidas por DMBA na mucosa de ratos em comparação à

mucosa normal, indicando que ela apresenta papel importante na transformação maligna da mucosa oral. Estes mesmos demonstraram aumento da transcrição de COL1A1 em amostras de CCEB. Resultados similares foram observados por HAYASHI et al. (2014) em amostras de carcinoma hepatocelular. Alterações epigenéticas de genes codificadores de colágeno têm sido descritas em diversas neoplasias. O aumento da transcrição de COL1A1, VTN e ITGA4 observado nas lesões de língua dos camundongos PAFRKO pode indicar aumento da interação célula-célula e célula-matriz com potenciais implicações na invasividade celular em estágios mais tardios da carcinogênese. Outro fator de crescimento com transcrição elevada nas lesões linguais após os camundongos WT C57BL/6 terem sido tratados com 4NQO foi FGF-1 (*fibroblast growth factor 1*). Este polipeptídeo apresenta diversas funções, dentre as quais se destaca sua ação na proliferação, diferenciação e angiogênese (MIYAKE et al., 1998). O desenvolvimento tumoral pode ser diretamente influenciado por alterações na sinalização celular via FGF, a qual pode resultar diretamente na proliferação e sobrevivência das células neoplásicas e na colaboração da angiogênese tumoral (MYOKEN et al., 1996; TURNER; GROSE, 2010). Perante estas características de FGF-1, podemos utilizá-lo como justificativa parcial para o aumento da proliferação celular nas lesões linguais dos camundongos WT C57BL/6 tratados ainda que o aumento de sua transcrição não tenha sido significativa em relação ao encontrado nas lesões dos camundongos PAFRKO.

Com relação às outras populações de células inflamatórias analisadas, não foram observadas modificações importantes nas populações de neutrófilos e macrófagos nas lesões de língua dos camundongos WT C57BL/6 tratados. Dados similares foram descritos por SAHU et al. (2012) em modelo de carcinoma de células escamosas de pele induzido quimicamente. Os autores não observaram alterações significativas nas populações de neutrófilos e macrófagos nas lesões neoplásicas dos camundongos WT C57BL/6 comparados aos animais PAFRKO, similar aos nossos achados nos camundongos WT C57BL/6 tratados.

EGF(*epidermal growth factor*) é um fator mitogênico e capaz de promover a proliferação e a diferenciação em vários tecidos (BERNARDES et al., 2010; SCHLESSINGER et al., 1983). EGF foi também descrito como fator indutor da transição epitélio-mesênquima em células de carcinoma de esôfago (CAI et al., 2009). RICHTER et al. (2011) demonstraram que a co-estimulação TGF- β 1/EGF induz ao fenótipo EMT em linhagem celular de CCEB. Ademais á indução da transição fenotípica, observou-se que a co-estimulação resultou em mudanças na capacidade destas células se aderirem às proteínas da matriz extracelular sendo observado aumento de adesão principalmente aos colágenos tipo I,

II III e IV. Todo o exposto corroboram na associação do aumento da transcrição de TGF- β 1 e EGF nas lesões linguais dos camundongos WT C57BL/6 tratados à característica predominantemente invasivas destas lesões. PAF induz proliferação celular através da ativação de EGFR

De forma geral, observamos que a transcrição dos fatores envolvidos na progressão da doença nos camundongos WT C57BL/6 são praticamente os mesmos fatores encontrados nos camundongos PAFRKO tratados, porém com transcrição exacerbada nestes últimos. Apesar desta similaridade encontrada entre o fatores analisados nestes camundongos, IL-17, TIMP-1 e IL-1 β apresentaram transcrição aumentada somente nos camundongos PAFRKO tratados. A ligação de PAF ao seu receptor resulta na transcrição de alguns genes codificadores de diversas citocinas (MELNIKOVA; BAR-ELI, 2007). O fato destas e outras proteínas envolvidas na progressão das lesões linguais dos camundongos WT C57BL/6 apresentarem transcrição aumentada nas lesões linguais dos camundongos PAFRKO tratados demonstram que a expressão delas não é exclusiva e primordialmente regulada por este mediador lipídico neste modelo de indução de carcinogênese bucal. A ausência congênita de PAFR nos camundongos transgênicos durante seu desenvolvimento pode levar a mecanismos compensatórios que “suavizem” seu fenótipo e resulte em aumento da resposta inflamatória (ISHII; SHIMIZU, 2000; SAHU et al., 2012).

A aparente discrepância entre os resultados *in vivo* e *in vitro* nos motivou a avaliar camundongos deficientes de PAFR de *background* genético BALB/c e os resultados observados foram diferentes dos obtidos com os camundongos PAFRKO tratados da linhagem C57BL/6. Dentre estes apontamos a ausência de lesões macroscópicas, menor escore histopatológico de displasia epitelial e baixa proliferação celular. Houve diminuição do infiltrado de eosinófilos local lesional e inalteração dos níveis séricos das citocinas CCL4, CCL5 e TNF- α .

O desenvolvimento neoplásico é complexo e envolve a interação de diferentes mecanismos em um processo multi-etapas. Com relação à susceptibilidade à indução carcinogênica, observam-se diferenças entre as variadas linhagens de camundongos (RODERICK, 1963; STORER; MITCHELL; FRY, 1988). Por exemplo, a linhagem C57BL/6 apresenta-se mais resistente à indução de câncer colo-retal, de mama e de cólon quando comparada à linhagem BALB/c (STORER et al., 1988; SUZUKI et al., 2006). Dentre os fatores implicados nestas diferenças, podemos citar os genéticos e os imunológicos. Modelos de câncer de pele induzido por radiação tem contribuído na demonstração da

influência dos fatores genéticos inatos às linhagens nas diferentes respostas à tumorigênese observada nos camundongos BALB/c e C57BL/6 (POPOVA et al., 2003; POPOVA et al., 2002). GUEDERS et al. (2009) e WALKIN et al. (2013) utilizando camundongos C57BL/6 e BALB/c tem demonstrado respostas imunológicas distintas entre estas duas linhagens. As diferentes respostas podem ser atribuídas a padrões inflamatórios distintos presentes nas duas linhagens. De forma inédita, os dados apresentados no presente estudo sugerem que as diferenças relativas à progressão tumoral entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c tratadas com 4NQO podem ser influenciadas por diferentes componentes imune-inflamatórios produzidas local e sistemicamente.

CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados podemos concluir que:

1. Há um aumento da produção do precursor de PAF (lyso-PAF) durante a carcinogênese bucal induzida em camundongos;
2. O antagonismo farmacológico do receptor de PAF resulta em inibição da invasão celular de linhagem metastática (HN12) de CCEB;
3. A ausência de sinalização de PAF em camundongos transgênicos C57BL/6 não altera a progressão da carcinogênese, porém camundongos PAFRKO;da linhagem BALB/c apresentam menor escore histológico de displasia epitelial;
4. A progressão tumoral é diferente para as linhagens BALB/c e WT C57BL/6, sendo os camundongos BALB/c mais resistentes à indução de lesões de língua.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. **Clin Chim Acta**, v. 436, p. 35-40, Sep 25 2014.

ALABASTER, V. A. et al. UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist, exhibits potent and long lasting activity in vivo. **Agents Actions Suppl**, v. 34, p. 221-7, 1991.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**: 1- 1728 p. 2002.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVES, C. C. M. et al. Carcinoma de Células Escamosas de Boca: Relação entre Graduação Histopatológica e Características Clínicas da Neoplasia. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 11, n. 4, p. 485-89, 2011.

APONTE, M. et al. Activation of platelet-activating factor receptor and pleiotropic effects on tyrosine phospho-EGFR/Src/FAK/paxillin in ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 68, n. 14, p. 5839-48, Jul 15 2008.

BACHI, A. L. et al. Apoptotic cells contribute to melanoma progression and this effect is partially mediated by the platelet-activating factor receptor. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 610371, 2012.

BARCELOS, L. S. et al. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 2, p. 352-8, Aug 2005.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. p. 177-179, 2005.

BARROS, S. S. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 8, p. 752-60, Aug 2011.

BEKTAŞ-KAYHAN, K. **Squamous Cell Carcinoma**. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0024-9.

BELAI, E. B. et al. PD-1 blockage delays murine squamous cell carcinoma development. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 2, p. 424-31, Feb 2014.

BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **J Exp Med**, v. 136, n. 6, p. 1356-77, Dec 1 1972.

BERNARDES, V. F. et al. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 40, 2010.

BESSELL, A. et al. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, p. CD006205, 2011.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia**. 7^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRAEUER, R. R. et al. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 2, p. 83-8, Apr 2011.

BUSSOLATI, B. et al. PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 157, n. 5, p. 1713-25, Nov 2000.

CAI, Z. et al. Mammary serine protease inhibitor inhibits epithelial growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition of esophageal carcinoma cells. **Cancer**, v. 115, n. 1, p. 36-48, Jan 1 2009.

CAO, Z.; XIANG, J.; LI, C. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 8, p. 880-5, Aug 2009.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 29 1995.

CHEEMA, V. S.; RAMESH, V.; BALAMURALI, P. D. The relevance of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **J Clin Diagn Res**, v. 6, n. 10, p. 1803-7, Dec 2012.

CHEN, J. et al. Platelet-activating factor receptor-mediated PI3K/AKT activation contributes to the malignant development of esophageal squamous cell carcinoma. **Oncogene**, Feb 2 2015.

CHEN, D. et al. Screening the pathogenic genes and pathways related to DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene)-induced transformation of hamster oral mucosa from precancerous lesions to squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 2, n. 4, p. 637-642, Jul 2011.

DAVIS, B. P.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils and cancer. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 1, p. 1-8, Jan 2014.

DE VICENTE, J. C. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 41, n. 3, p. 283-93, Mar 2005.

DENIZOT, Y. et al. Platelet-activating factor and human thyroid cancer. **Eur J Endocrinol**, v. 153, n. 1, p. 31-40, Jul 2005.

DENIZOT, Y. et al. Is there a role of platelet-activating factor in human lung cancer? **Lung Cancer**, v. 33, n. 2-3, p. 195-202, Aug-Sep 2001.

DENIZOT, Y. et al. Tissue concentrations of platelet-activating factor in colorectal carcinoma: inverse relationships with Dukes' stage of patients. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7222-4, Oct 16 2003.

DENIZOT, Y. et al. Elevated plasma phospholipase A2 and platelet-activating factor acetylhydrolase activity in colorectal cancer. **Mediators Inflamm**, v. 13, n. 1, p. 53-4, Feb 2004.

DORSAM, R. T.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 2, p. 79-94, Feb 2007.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137-48, Aug 2004.

DYER, K. D. et al. Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factor (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. **J Immunol**, v. 184, n. 11, p. 6327-34, Jun 1 2010.

ERCAN, I. et al. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in cancer of the larynx. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, n. 6, p. 869-73, Jun 2005.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Journal of Cancer Therapy**, v. 03, n. 04, p. 263-268, 2012.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 237, p. 1-30, 1999.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-76, Jun 2003.

FERREIRA, M. A. et al. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 7, p. 1185-92, Apr 2004.

FERREIRA, M. A. et al. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 210-7, Jun 27 2007.

GANNOT, G.; BUCHNER, A.; KEISARI, Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. **Oral Oncol**, v. 40, n. 3, p. 287-97, Mar 2004.

GUEDERS, M. M. et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflamm Res**, v. 58, n. 12, p. 845-54, Dec 2009.

HANSEN, W. Neuropilin 1 guides regulatory T cells into VEGF-producing melanoma. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 2, p. e23039, Feb 1 2013.

HAYASHI, M. et al. Identification of the collagen type 1 alpha 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 14, p. 108, 2014.

HEYMAN, L. et al. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. **Tumour Biol**, v. 29, n. 4, p. 231-44, 2008.

HEYMAN, L. et al. Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells. **Cell Biol Int**, v. 34, n. 5, p. 493-502, May 2010.

HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 549-80, Dec 2004.

HOLZMANN, B.; GOSSLAR, U.; BITTNER, M. alpha 4 integrins and tumor metastasis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 231, p. 125-41, 1998.

HONG, D. S.; ANGELO, L. S.; KURZROCK, R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. **Cancer**, v. 110, n. 9, p. 1911-28, Nov 1 2007.

HONG, S. D. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncol**, v. 36, n. 2, p. 207-13, Mar 2000.

HSIEH, L. L. et al. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 9, p. 1497-503, Sep 2001.

HWANG, Y. S. et al. Secretion of IL-6 and IL-8 from lysophosphatidic acid-stimulated oral squamous cell carcinoma promotes osteoclastogenesis and bone resorption. **Oral Oncol**, v. 48, n. 1, p. 40-8, Jan 2012.

IM, S. Y. et al. Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. **Cancer Res**, v. 56, n. 11, p. 2662-5, Jun 1 1996.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: 2014.

ISHII, S. et al. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. **J Exp Med**, v. 187, n. 11, p. 1779-88, Jun 1 1998.

ISHII, S.; NAGASE, T.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor receptor. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 599-609, Aug 2002.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog Lipid Res**, v. 39, n. 1, p. 41-82, Jan 2000.

ISHIURA, Y. et al. In vivo PAF-induced airway eosinophil accumulation reduces bronchial responsiveness to inhaled histamine. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 75, n. 1-4, p. 1-12, Jan 2005.

JOHNSON, S. D.; DE COSTA, A. M.; YOUNG, M. R. Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 2, p. 756-70, 2014.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 42, n. 7, p. 655-67, Aug 2006.

KASKAS, N. M. et al. Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 140, n. 1, p. 5-11, Jan 2014.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp Dermatol**, v. 12, n. 2, p. 109-25, Apr 2003.

KITAGAWA, D. et al. Expression of platelet-activating factor receptor: a novel prognosticator in patients with hepatocellular carcinoma following hepatectomy. **Oncology**, v. 72, n. 5-6, p. 381-7, 2007.

KO, H. H. et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor mRNA level is significantly related to progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas. **J Formos Med Assoc**, v. 114, n. 7, p. 605-11, Jul 2015.

KOLLIAS, G. et al. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. **Ann Rheum Dis**, v. 58 Suppl 1, p. I32-9, Nov 1999.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66-83, 2013.

KRYCZEK, I. et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 357-9, Jul 9 2009.

KUPFERMAN, M. E.; MYERS, J. N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 39, n. 2, p. 229-47, Apr 2006.

KURAHARA, S. et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. **Head Neck**, v. 21, n. 7, p. 627-38, Oct 1999.

KUSUKAWA, J. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. **Am J Clin Pathol**, v. 99, n. 1, p. 18-23, Jan 1993.

LEE, C. H. et al. IL-1beta promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 4, p. 875-84, Apr 2015.

LEE, S. H. et al. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. **Ann Surg Treat Res**, v. 89, n. 1, p. 1-8, Jul 2015.

LEJEUNE, F. J.; RUEGG, C.; LIENARD, D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. **Curr Opin Immunol**, v. 10, n. 5, p. 573-80, Oct 1998.

LI, J. et al. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 49, n. 4, p. 299-305, Apr 2013.

LINGEN, M. W. et al. The angiogenic switch in hamster buccal pouch keratinocytes is dependent on TGFbeta-1 and is unaffected by ras activation. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p. 329-38, Feb 1997.

LLEWELLYN, B. D. An improved Sirius red method for amyloid. **J Med Lab Technol**, v. 27, n. 3, p. 308-9, Jul 1970.

LU, S. L.; HERRINGTON, H.; WANG, X. J. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. **Head Neck**, v. 28, n. 10, p. 945-54, Oct 2006.

LV, L. et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18219, 2011.

MADEIRA, M. F. et al. Platelet-activating factor receptor blockade ameliorates Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice. **Infect Immun**, v. 81, n. 11, p. 4244-51, Nov 2013.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 24 2008.

MARTINELLI-KLAY, C. P.; MENDIS, B. R.; LOMBARDI, T. Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: a short review. **J Oncol**, v. 2009, p. 310132, 2009.

MARTÍNEZ, C. A. R. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. **Int. J. Morphol.**, v. 30, n. 1, p. 309-314, 2012.

MASSANO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 1, p. 67-76, Jul 2006.

MATHONNET, M. et al. Platelet-activating factor in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 17, p. 2773-8, May 7 2006.

MCHOWAT, J. et al. Platelet-activating factor and metastasis: calcium-independent phospholipase A2beta deficiency protects against breast cancer metastasis to the lung. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 300, n. 4, p. C825-32, Apr 2011.

MELNIKOVA, V.; BAR-ELI, M. Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 3-4, p. 359-71, Dec 2007.

MELNIKOVA, V. O.; VILLARES, G. J.; BAR-ELI, M. Emerging roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis. **Cancer Microenviron**, v. 1, n. 1, p. 103-11, Dec 2008.

MEYERHOLZ, D. K. et al. Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in an RSV vaccine-enhanced inflammation model. **Toxicol Pathol**, v. 37, n. 2, p. 249-55, Feb 2009.

MIYAKE, A. et al. Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 243, n. 1, p. 148-52, Feb 4 1998.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncol**, v. 42, n. 5, p. 448-60, May 2006.

MONTRUCCHIO, G. et al. Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. **Am J Pathol**, v. 153, n. 5, p. 1589-96, Nov 1998.

MOORE, R. J. et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. **Nat Med**, v. 5, n. 7, p. 828-31, Jul 1999.

MOYANO CARDABA, C. et al. CCL3 induced migration occurs independently of intracellular calcium release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 418, n. 1, p. 17-21, Feb 3 2012.

MYOKEN, Y. et al. Expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in a human salivary-gland adenocarcinoma cell line: evidence of growth. **Int J Cancer**, v. 65, n. 5, p. 650-7, Mar 1 1996.

NAKASONE, E. S. et al. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 488-503, Apr 17 2012.

NAUGLER, W. E.; KARIN, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 3, p. 109-19, Mar 2008.

NAYLOR, M. S. et al. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 2194-206, May 1993.

NEGUS, R. P. et al. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **Am J Pathol**, v. 150, n. 5, p. 1723-34, May 1997.

NEUCHRIST, C. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. **Acta Otolaryngol**, v. 119, n. 6, p. 732-8, 1999.

OSMAN, T. A.; COSTEA, D. E.; JOHANNESSEN, A. C. The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma : A review of the literature. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 2, p. 256-61, May 2012.

PARRY, M. J. et al. Pharmacological profile of UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist with potent and prolonged oral activity. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v. 10, n. 3, p. 251-68, Sep 1994.

PIVA, M. R. et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF-alpha, TGF-beta and NF-kappaB expression. **Oncol Lett**, v. 5, n. 6, p. 1909-1914, Jun 2013.

PONS, F. et al. Role of platelet-activating factor (PAF) in platelet accumulation in rabbit skin: effect of the novel long-acting PAF antagonist, UK-74,505. **Br J Pharmacol**, v. 109, n. 1, p. 234-42, May 1993.

POPOVA, N. V. et al. Identification of two keratinocyte stem cell regulatory loci implicated in skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 417-25, Mar 2003.

POPOVA, N. V. et al. Evidence that the keratinocyte colony number is genetically controlled. **Exp Dermatol**, v. 11, n. 6, p. 503-8, Dec 2002.

PUNYANI, S. R.; SATHAWANE, R. S. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Investig**, v. 17, n. 2, p. 517-24, Mar 2013.

RAHMANI, A. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 5, n. 9, p. 965-71, 2012.

RAJU, B.; IBRAHIM, S. O. Pathophysiology of oral cancer in experimental animal models: a review with focus on the role of sympathetic nerves. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 1, p. 1-9, Jan 2011.

REZENDE, B. M. **Lithothamnion muelleri regula a resposta inflamatória, lesão de órgãos alvo e letalidade na doença do enxerto-versus-hospedeiro**, 2012 (Dissertação de Mestrado). Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/ UFMG), Universidade Federal de Minas Gerais.

RICHTER, P. et al. EGF/TGFbeta1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 1, p. 46-54, Jan 2011.

RIEDEL, F. et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v. 20, n. 5A, p. 3045-9, Sep-Oct 2000.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncol Lett**, v. 8, n. 1, p. 7-11, Jul 2014.

ROBERTS, A. B.; WAKEFIELD, L. M. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8621-3, Jul 22 2003.

RODERICK, T. H. The Response of Twenty-Seven Inbred Strains of Mice to Daily Doses of Whole-Body X-Irradiation. **Radiat Res**, v. 20, p. 631-9, Dec 1963.

ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 1, p. 9-22, Jan 2013.

ROSKOSKI, R., Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 62, n. 3, p. 179-213, Jun 2007.

SAHU, R. P. et al. Loss of the platelet activating factor receptor in mice augments PMA-induced inflammation and cutaneous chemical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 3, p. 694-701, Mar 2012.

SAID, M. et al. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. **BMC Clin Pathol**, v. 5, n. 1, p. 1, Jan 7 2005.

SALO, T. et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. **Exp Cell Res**, v. 325, n. 2, p. 58-64, Jul 15 2014.

SAMBANDAM, Y. et al. CXCL13 activation of c-Myc induces RANK ligand expression in stromal/preosteoblast cells in the oral squamous cell carcinoma tumor-bone microenvironment. **Oncogene**, v. 32, n. 1, p. 97-105, Jan 3 2013.

SCHLESSINGER, J. et al. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. **CRC Crit Rev Biochem**, v. 14, n. 2, p. 93-111, 1983.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 388-99, Sep 2009.

SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 123-50, 2009.

SHINDOU, H. et al. Roles of cytosolic phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptor in the Ca-induced biosynthesis of PAF. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 271, n. 3, p. 812-7, May 19 2000.

SILVA, J. M. et al. Eosinophil depletion protects mice from tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **Histol Histopathol**, v. 29, n. 3, p. 387-96, Mar 2014.

SILVA, J. M. **Participação da quimiocina CCL3 na carcinogênese bucal induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos**, 2012. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Odontologia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais

SILVA, T. A. et al. Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. **Oncol Rep**, v. 18, n. 5, p. 1107-13, Nov 2007.

SIMSON, L. et al. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4222-9, Apr 1 2007.

SKRINJAR, I. et al. Evaluation of pretreatment serum interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha as a potential biomarker for recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 20, n. 4, p. e402-7, 2015.

SMITH, E. M. et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 6, p. 449-55, Mar 17 2004.

STORER, J. B.; MITCHELL, T. J.; FRY, R. J. Extrapolation of the relative risk of radiogenic neoplasms across mouse strains and to man. **Radiat Res**, v. 114, n. 2, p. 331-53, May 1988.

SUZUKI, R. et al. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 1, p. 162-9, Jan 2006.

TANG, X. H. et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 1 Pt 1, p. 301-13, Jan 1 2004.

TISCHER, E. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **J Biol Chem**, v. 266, n. 18, p. 11947-54, Jun 25 1991.

TOSTES OLIVEIRA, D. et al. Tissue eosinophilia and its association with tumoral invasion of oral cancer. **Int J Surg Pathol**, v. 17, n. 3, p. 244-9, Jun 2009.

TSOUPRAS, A. B. et al. The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants. **Infect Disord Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 390-9, Aug 2009.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010.

VADAS, P. et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1, p. 28-35, Jan 3 2008.

VAIRAKTARIS, E. et al. Gene expression polymorphisms of interleukins-1 beta, -4, -6, -8, -10, and tumor necrosis factors-alpha, -beta: regression analysis of their effect upon oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 8, p. 821-32, Aug 2008.

WALKIN, L. et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 6, n. 1, p. 18, 2013.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, 2002.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **Am J Pathol**, v. 147, n. 1, p. 9-19, Jul 1995.

WELCH, E. J. et al. Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet-activating factor on neutrophil and platelet activation. **Mol Pharmacol**, v. 75, n. 1, p. 227-34, Jan 2009.

WESTERMARCK, J.; KAHARI, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB J**, v. 13, n. 8, p. 781-92, May 1999.

WILKEY, J. F. et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. **Mol Carcinog**, v. 48, n. 9, p. 853-61, Sep 2009.

WU, M. H. et al. Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 6, p. 1306-16, Mar 15 2011.

YANG, Y.; ZHOU, Z. T.; GE, J. P. Effect of genistein on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 578-83, Mar 2006.

YOUNG, S. A. et al. Integrin alpha4 Enhances Metastasis and May Be Associated with Poor Prognosis in MYCNlow Neuroblastoma. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0120815, 2015.

YU, Y. et al. Epidermal growth factor induces platelet-activating factor production through receptors transactivation and cytosolic phospholipase A2 in ovarian cancer cells. **J Ovarian Res**, v. 7, p. 39, 2014.

ZENKLUSEN, J. C. et al. Transforming growth factor-beta 1 expression in Syrian hamster cheek pouch carcinogenesis. **Mol Carcinog**, v. 9, n. 1, p. 10-6, Jan 1994.

ZHANG, J. P. et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **J Hepatol**, v. 50, n. 5, p. 980-9, May 2009.

ZHAO, S. F. et al. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. **Tumour Biol**, v. 34, n. 5, p. 3165-71, Oct 2013.

ZHONG, Y. et al. Molecular markers of tumor invasiveness in ameloblastoma: An update.
Ann Maxillofac Surg, v. 1, n. 2, p. 145-9, Jul 2011.

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/ UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 12/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Participação do infiltrado inflamatório peritumoral e da quimiocina MIP-1A/CCL3 na carcinogênese bucal**", que tem como responsável(is) **Tarcília Aparecida Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **30/ 03/2011**.

Este certificado expira-se em **30/ 03/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 12/2011**, related to the project entitled "**Role of peritumoral inflammatory infiltrate and the chemokine MIP-1^α/CCL3 on oral carcinogenesis**", under the supervisors of **Tarcília Aparecida Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 30, 2011**.

This certificate expires in **March 30, 2016**.

Belo Horizonte, 4 de Abril de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)