

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

EDUARDO LIBERATO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA
CARCINOGENESE BUCAL *IN VIVO***

Porto Alegre

2018

EDUARDO LIBERATO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA
CARCINOGENESE BUCAL *IN VIVO***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do
título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Fernanda Visioli

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Eduardo Liberato da
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA
CARCINOGENESE BUCAL IN VIVO / Eduardo Liberato da
Silva. -- 2018.

47 f.

Orientador: Fernanda Visioli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. Cancer bucal. 2. Carcinogênese bucal. 3.
GRP78. 4. Ácido Docosahexaenóico. 5. Modelo animal.
I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais Waldair e Márcia e meus irmãos Fernando e Guilherme, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, e nunca deixaram que me faltasse nada, inclusive nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós e tia avó Elena, pelo estímulo ao estudo desde criança, muitos ensinamentos, troca de experiências e pelo suporte dado ao longo de toda minha vida.

Aos meus parceiros de moradia, Samuel e Guilherme que junto com meu irmão Fernando compartilharam muitos momentos comigo e com certeza tornaram essa etapa muito menos desgastante.

Aos meus amigos de Lajeado, que muitos deles conheço desde que nasci e que nunca me deixaram de lado, mesmo quando me ausentava por tempos prolongados. São considerados parte da família.

Aos meus amigos que adquiri desde que entrei na faculdade em Porto Alegre, e que tive o prazer de compartilhar momentos que serão eternizados na minha história. Com certeza, mantereí essas amizades por muito tempo. Tornaram-se irmãos para mim.

À minha ex-preceptora Caren Bavaresco, com quem compartilhei 320 horas de estágio, e com quem pude compartilhar muito mais do que conhecimentos de atenção primária. Ensinamentos que levarei sempre comigo.

Aos meus professores que tive ao longo do curso de Odontologia e que me estimularam sempre a crescer cada vez mais. Prof. Manoela, Prof. Marco e Prof. Vínicius pelo incentivo, por serem exemplos de profissionais e por terem me ensinado muito além da Patologia, me auxiliando em inúmeros momentos que precisei. Obrigado pela confiança e pela amizade. Em nome destes, agradeço aos demais professores que hoje se tornaram grandes amigos.

Ao Marcelo e Prof. Tiago Fiorini, por estarem junto comigo coordenando a 49ª SEMAC, que foi um grande desafio para mim. Obrigado pela parceria, troca de experiências, paciência e grandes momentos juntos.

Ao grupo de pesquisa, alunos de pós-graduação e professores da Patologia, com quem convivi durante muito tempo, e que acabaram se tornando uma segunda família. Obrigado por me ajudarem em todos os momentos, por disponibilizar seu tempo para auxiliar o próximo. Esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

À Isadora Follak, que junto comigo conduziu este trabalho e que me auxiliou em diversos momentos. Obrigado por ter compartilhado tanto tempo comigo.

Por último, à minha orientadora Fernanda Visioli, que por mais que eu escreva aqui, não seria possível descrever minha gratidão. Posso dividir minha vivência acadêmica em dois momentos, anterior e posterior à orientação. Aprendi além da patologia, a ser mais humano, paciente, trabalhar em silêncio sem buscar elogios, simplicidade, tratar sempre bem as pessoas independente da ocupação. Obrigado pela amizade, pelo suporte, por entender e potencializar o ponto forte de cada orientado, buscando sempre o estímulo à superação. Tu és um exemplo de professora e ser humano.

RESUMO

O câncer bucal se caracteriza por um crescimento desordenado e descontrolado de células, invadindo os tecidos adjacentes e formando massas tumorais malignas. É uma doença multifatorial, mas os principais fatores de risco são hábitos como fumo e consumo de álcool. A carcinogênese se inicia após a célula acumular alterações que a façam perder a capacidade de indução da apoptose associada a uma proliferação intensa e descontrolada. O retículo endoplasmático e a via “unfolded protein response” (UPR) desempenham papel importante nesse mecanismo. A super-expressão da proteína GRP78 (reguladora da ativação da UPR) já foi detectada em vários tipos de câncer, associada a um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico. O ácido Docosahexaenóico (DHA), componente derivado do Omega 3, surgiu como opção potencialmente preventiva devido à sua atividade pró-apoptótica, em parte por regular a expressão de GRP78 durante a carcinogênese. O objetivo deste artigo foi avaliar o efeito preventivo do DHA na carcinogênese bucal por meio de modelo animal com 86 ratos Wistar. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle (Grupo 1), indução de carcinogênese (Grupo 2), indução de carcinogênese associada ao tratamento com óleo de peixe enriquecido com DHA (Grupo 3). A carcinogênese foi induzida com a aplicação tópica em borda direita de língua de 4NQO associado à ingestão de solução alcoólica 15%. Um grupo de animais recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA por meio de gavagem. O desenvolvimento das lesões em língua foi avaliado durante 8(n=28), 15(n=28) e 24(n=30) semanas, quanto ao tipo, número, área e diagnóstico histopatológico. O peso dos animais, assim como o consumo de ração e líquidos foi monitorado ao longo do tempo. Observamos um consumo médio significativamente menor de ração e líquidos nos grupos onde a carcinogênese foi induzida. Lesões clínicas foram detectadas a partir de 15 semanas: duas leucoplasias, uma no grupo 2 e uma no grupo 3. Enquanto que em 24 semanas, todos os animais dos grupos 2 e 3 desenvolveram leucoplasias e/ou leucoeritroplasias. Não houve diferença quanto ao número e a área das lesões entre o grupo 2 e o grupo 3 nos tempos de 15 e 24 semanas. Em relação às alterações histopatológicas, no tempo 8 semanas foram diagnosticadas alterações epiteliais de hiperplasia epitelial e/ou hiperqueratose em 5 e 7 animais dos grupos 2 e 3 respectivamente. Em 15 semanas, 81,82% e 98,91% dos animais apresentavam alterações epiteliais dos grupos 2 e 3 respectivamente. No tempo de 24 semanas, já foi possível identificar displasias epiteliais em mais de 90% dos animais onde a carcinogênese foi induzida. A administração de óleo de peixe enriquecido em DHA não alterou a carcinogênese em língua de ratos.

Palavras-chave: Câncer bucal. Carcinogênese bucal. GRP78. Ácido Docosahexaenóico. Modelo animal.

ABSTRACT

Oral cancer is characterized by a disordered and uncontrolled growth of cells, invading adjacent tissues and forming malignant tumor masses. It is a multifactorial disease, but the main risk factors are habits such as smoking and alcohol consumption. Carcinogenesis starts when cells accumulate alterations that results in loss of apoptosis induction capacity associated with intense and uncontrolled proliferation. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response (UPR) play an important role in this mechanism. The overexpression of the GRP78 protein (regulator of UPR activation) has already been detected in several types of cancer, associated with a more aggressive phenotype and worst prognosis. Docosahexaenoic acid (DHA), a component of Omega 3, has emerged as a potentially preventive option due to its pro-apoptotic activity, in part by regulating GRP78 expression during the carcinogenesis. The objective of this article is to evaluate the UPR pathway in oral carcinogenesis and the therapeutic effect of DHA on oral cancer, by means of an animal model with 86 Wistar rats. The animals were divided in three groups: control (Group 1), carcinogenesis induction (Group 2), carcinogenesis induction associated with treatment of fish oil enriched with DHA (Group 3). Carcinogenesis was induced by 4NQO topical application on the right border of the tongue associated with 15% alcohol solution ingest. A group of animals received fish oil enriched with DHA through gavage. Lesions type, number, area and histopathological diagnostic, development in tongue was evaluated during 8(n=28), 15(n=28) and 24(n=30) weeks. The weight of the animals, as well as the feed and liquid consumption was monitored over time. We observed a significantly lower average consumption of feed and liquids in the groups where carcinogenesis was induced. Clinical lesions were detected from 15 weeks: two leukoplasias, one in group 2 and one in group 3. At 24 weeks, all animals in groups 2 and 3 developed leukoplasias and/or leukoeritropasias. There was no difference in number and area of lesions among groups 2 and 3 at 15 and 24 weeks. Regarding histopathological alterations, at the time 8 weeks, epithelial hyperplasia and/or hiperkeratosis were diagnosed in 5 and 7 animals from group 2 and 3 respectively. At 15 weeks, 81.82% and 98.91% of the animals presented epithelial alterations in groups 2 and 3 respectively. At the time of 24 weeks, it has been possible to identify epithelial dysplasia in more than 90% of the animals where carcinogenesis was induced. Fish oil enriched with DHA treatment does not change tongue carcinogenesis.

Keywords: Oral cancer. Oral carcinogenesis. Unfolded Protein Response. GRP78. Docosahexaenoic acid. Animal model.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	7
1.1	CÂNCER BUCAL.....	7
1.2	RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO E SEU ESTRESSE.....	8
1.3	VIA UPR (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) E SUAS PROTEÍNAS.....	9
1.4	A UPR E A CARCINOGENESE.....	10
1.5	ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA).....	12
1.6	MODELOS DE CARCINOGENESE.....	14
1.6.1	MODELOS QUÍMICOS.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS.....	17
3	ARTIGO CIENTIFICO.....	18
4	CONCLUSÃO.....	41
	REFERENCIAS.....	42
	ANEXO A - Aprovação pela comissão de ética no uso de animais.....	48

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 CÂNCER BUCAL

O câncer é uma doença maligna que tem como principal característica o crescimento desordenado e descontrolado de células. Essas por sua vez, invadem os tecidos e órgãos, devido à capacidade de multiplicação e migração que possuem, assim determinando a formação de tumores clinicamente detectáveis (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). O Ministério da Saúde, (BRASIL, 2015) estimou para 2016 o registro de 596.070 novos casos de câncer no Brasil. Destes, 15.490 serão na cavidade bucal.

A etiologia do câncer de boca é multifatorial, no entanto os principais fatores de risco são hábitos como fumo e consumo de álcool. Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamentos, a taxa de sobrevida dos pacientes após 5 anos tem-se mantido em, aproximadamente, apenas 50% (WARNAKULASURIYA, 2010; KUMAR et al., 2016). As altas taxas de mortalidade se devem ao diagnóstico tardio e às opções limitadas de tratamento, como cirurgia e radioterapia, sendo que a quimioterapia ainda não apresenta impacto significativo na sobrevida dos pacientes com câncer de boca. A falta de opções de tratamento vem aumentando a busca por um melhor entendimento e conhecimento sobre o processo de carcinogênese (SIDHU et al., 2015).

O carcinoma espinocelular bucal é a neoplasia maligna mais comum da cavidade bucal e é derivada de células epiteliais de revestimento da mucosa bucal, pode ser chamado também de carcinoma epidermóide ou carcinoma de células escamosas (BRENER et al., 2007). É caracterizado por ser uma neoplasia epitelial invasiva que apresenta variados graus de diferenciação escamosa e propensão de produzir metástases para os nódulos linfáticos (PEREIRA et al., 2007).

Em relação à carcinogênese, a mesma inicia-se após a célula acumular alterações suficientes que a façam perder a capacidade de reparo de DNA e indução à apoptose, associado a uma proliferação intensa e descontrolada. Além disso, o ilimitado potencial replicativo, a autossuficiência sobre os sinais de crescimento e a insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, a evasão da apoptose, a angiogênese, e a invasão de tecidos e metástases, são características-chaves que a célula desenvolve ao se tornar cancerígena (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Somando à isso, a desregulação da apoptose é um dos eventos mais importantes da carcinogênese. O controle da apoptose envolve genes supressores de tumores, oncogenes, genes da família Bcl-2, receptor de fatores apoptóticos e mitocondriais e caspases (JAIN et al., 2014). Em casos de células que se encontram sob a ação de agentes estressantes, essas podem ser induzidas a apoptose pelo retículo endoplasmático (GIAMPIETRI et al., 2015).

Diversos estudos já relatam que o estresse do retículo endoplasmático (RE) e a ativação da via de resposta da proteína mal dobrada (UPR) estão envolvidos no surgimento e progressão do câncer de cabeça e pescoço (LIN et al., 2010; SLOTTA-HUSPENINA et al., 2012).

1.2 O RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO E SEU ESTRESSE

O estudo do envolvimento do RER no câncer bucal é importante por este ser uma organela composta por uma membrana contínua, responsável pela síntese, enovelamento e maturação de proteínas (SAIBIL, 2008). A alteração da homeostase no RE pode ocorrer devido a agentes estressores como diminuição dos níveis de cálcio, diminuição dos níveis de glicose, hipóxia, isquemia, mutações genéticas que produzem proteínas alteradas, alterações nos níveis redox, infecções virais, entre outras que resultam no aumento da síntese de proteínas mal dobradas. (KAUFMAN, 2002). A agregação de proteínas é tóxica para a célula e muitas condições patológicas são associadas ao estresse do RER, como doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer (SZEGEZDI et al., 2006). O estresse do RER induzirá a via adaptativa UPR (unfolded protein response), que por sua vez irá ativar genes envolvidos na manutenção da homeostase (KAUFMAN, 2002).

O enovelamento correto das proteínas ocorre com auxílio das chaperonas (SAIBIL, 2008). Estas fazem parte de uma família de proteínas, que tem como uma das suas funções, o envio das proteínas que não atingiram a configuração correta para destruição. As chaperonas usam energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, possibilitando um novo enovelamento, dessa vez na forma correta ou no lugar correto. Porém erros podem acontecer causando um mal dobramento destas proteínas, que podem resultar em mal funcionamento celular. Se

isso ocorrer as chaperonas encaminharão estas proteínas mal dobradas à destruição (FENTON; HORWICH, 2003).

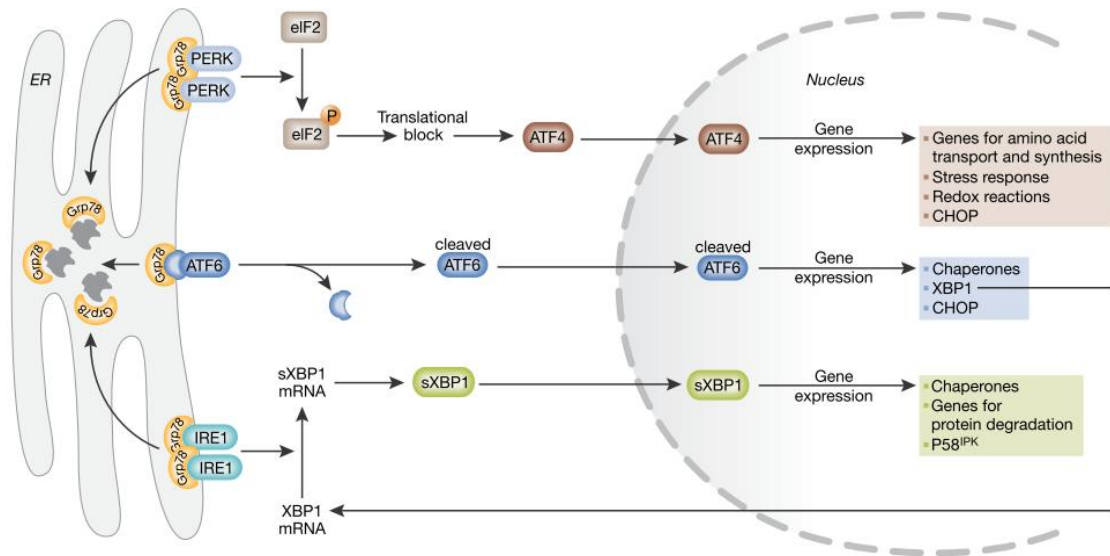
1.3 VIA UPR (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) E SUAS PROTEÍNAS

A UPR é uma via de transdução de sinal que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvos, envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005; RON; WALTER, 2007). A UPR apresenta dupla função, em um primeiro momento, ela atenua os danos associados com o estresse no RER, porém se isso não for possível, ou suficiente, ela ativa a apoptose da célula (WANG; GROENENDYK; MICHALAK, 2014).

A proteína GRP78 (proteína regulada por glicose 78), também chamada de BIP (proteína de ligação de imunoglobulinas), funciona como um sinal de retenção no RE. Quando proteínas mal enoveladas se acumulam abundantemente no interior do RE, as chaperonas se ligam a elas. Porém a função da GRP78 não é realizar o enovelamento das proteínas, mas mantê-las no RER num estado favorável ao enovelamento (LEE, 2005).

Na tentativa de restabelecer esta homeostasia do RER, a via UPR é ativada, a qual é regulada por três proteínas transmembranas, a enzima dependente de inositol-1 (IRE1 α), fator de ativação transcricional 6 (ATF6) e quinase do retículo endoplasmático PKR-like (PERK), ilustrado na figura 1. Estas proteínas se encontram normalmente ligadas à chaperona GRP78, pelo domínio amino-terminal da PERK e da IRE1, e ao domínio carboxi-terminal da proteína ATF6, quando o RE encontra-se em homeostasia. Porém em situações de estresse as três proteínas são liberadas através do desligamento da GRP78 que é recrutada para auxiliar no enovelamento proteico (KAUFMAN, 2002; SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005; WANG; KAUFMAN, 2014; GIAMPIETRI et al., 2015).

FIGURA 1 - Esquema da via UPR



Fonte: SZEGEZDI et al., 2006, p.882

O mecanismo de atuação desta via existe para remover as proteínas mal dobradas, fazendo com que a síntese destas volte ao normal e assim a célula também retorne ao seu funcionamento normal. Se o estresse for muito intenso ou prolongado, a via perde a capacidade de remover as proteínas mal dobradas e encaminha a célula para apoptose. Quando o estresse é de forma crônica as células mantêm a UPR ativa para que as proteínas mal dobradas sejam corrigidas, isso faz com que a própria célula se adapte ao estímulo agressor e sobreviva. Este processo de adaptação da célula ainda não é bem compreendido (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2007).

1.4 A UPR E A CARCINOGENESE

Novas evidências sugerem que a ativação da UPR é necessária para a transformação oncogênica. Como a UPR exerce tanto efeitos protetores e deletérios sobre a sobrevivência das células após estresse do RER, a ativação da UPR pode facilitar, bem como suprimir a transformação maligna. Portanto, haveria uma vantagem seletiva para células pré-malignas com mutações de genes que inibem a apoptose induzida por UPR (WANG; KAUFMAN, 2014).

A ativação da UPR que é gerada pelo estresse no RER, serve inicialmente como uma medida adaptativa para proteger a célula contra danos irreversíveis. Entretanto, quando este dano se torna muito intenso, a UPR libera um sinal de autodestruição

para o organismo se livrar da célula lesada e evitar uma maior toxicidade (WANG; GROENENDYK; MICHALAK, 2014). Em condições normais, estes são os fatores que contribuem para a morte celular mediada pelo stress do RE, mas as células cancerosas evoluem e criam formas de se adaptar a esse estresse ambiental e assim, escapar do destino de apoptose. No microambiente hostil do tumor a UPR promove a capacidade das células de se adaptarem e sobreviverem através da ativação de vias de resposta ao estresse e aumento da expressão de chaperonas. As evidências apontam que células cancerígenas se adaptam ao microambiente tumoral em parte pelo aumento da expressão de GRP78 (WANG; GROENENDYK; MICHALAK, 2014).

Além disso, as células apresentam uma atividade altamente proliferativa mesmo com pouca vascularização, criando um microambiente desfavorável consistido de baixo pH, baixo oxigênio e pouca glicose, além de outros fornecimento de nutrientes (BROWN; GIACCIA, 1998). Pouca disponibilidade de glicose afeta a glicosilação de proteínas e produção de ATP, levando ao acúmulo de proteínas deformadas no RE (PARK et al., 2004). Assim como em condições de hipóxia, a falta de oxigênio coloca uma maior demanda sobre o dobramento de proteínas (TU; WEISSMAN, 2002).

Portanto, a UPR é um mecanismo de adaptação essencial que a célula possui para se proteger de danos, porém ela acaba em alguns casos sendo usada em vários processos celulares para a patogênese do câncer. Ela desempenha um papel em diversas vias de sinalização na transformação, invasão celular, migração celular, metástase, neovascularização, proliferação e manutenção do metabolismo energético das células cancerígenas. A UPR é desencadeada pela mudança no microambiente geralmente conduzida por hipóxia, acidose, e privação de nutrientes (NAGELKERKE et al., 2013; HAZARI et al., 2016).

Finalmente, a super-expressão de GRP78 foi vista em vários tipos de câncer, e um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico foram observados no câncer da próstata que superexpressam esta proteína. A presença desta proteína é um marcador da via UPR nas células (DICKS et al., 2015; VISIOLI et al., 2014).

1.5 ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)

O ácido docosahexaenóico (DHA), cadeia longa de Ômega 3 (FIGURA 2), faz parte do grupo de ácidos graxos polinsaturados essenciais (PUFAs) que possuem papel importante na estrutura da membrana celular, fluidez e sinalização celular (CALDER, 2011). Se ingeridas ou sintetizadas, PUFAs são oxidadas para geração de energia, estocadas como triacilglicerol ou convertidos em membranas fosfolípídicas para eventuais usos como substrato pelas enzimas COX (cicloxygenase) e LOX (lipoxigenase), ou usadas como ligantes de receptores G (CALDER, 2013a).

A designação 3 na estrutura (Ômega-3) refere-se à dupla ligação ao terceiro carbono no grupo metila (CALDER, 2011). Ômega-3, principalmente DHA e ácido eicosapentaenóico (EPA), são comumente atribuídos a ácidos graxos de origem marinha, e são mais facilmente obtidos através de peixes de água fria, como salmão (RUSSO, 2009), além de óleo de peixe e algas (BOUGNOUX et al., 2009). Ao menos que o DHA e EPA sejam ingeridos diretamente, eles são derivados do alfa-ácido linoléico (ALA), o qual possui grande afinidade com desaturases e elongases, enzimas que participam do processo de conversão de ALA para EPA e em seguida para DHA (RUSSO, 2009). Ômega-3 e seus derivados são importantes para o desenvolvimento da retina e cérebro, função cognitiva, e possuem papel anti-inflamatório pela produção de eicosanoides minimamente inflamatórios e mediadores inibidores de inflamação como protectinas e resolvinas (ROSE; CONNOLLY, 1999).

Estudos apontaram que o DHA é um fator protetor para câncer de mama em humanos (SHANNON et al., 2007) e em animais (SIGNORI et al., 2011). O consumo de DHA e EPA foi associado com redução de recidiva e mortalidade de câncer de mama em mulheres (PATTERSON et al., 2011). Além disso, demonstrou efeito protetor para câncer de cólon (FASANO et al., 2012) e próstata em modelos animais (ZHANG et al., 2016) e *in vitro* (LI et al., 2014).

FIGURA 2 – PUFAs e seus compostos.



Fonte: do Autor, 2018

Entre os mecanismos já demonstrados que explicam a redução do risco de câncer de mama pelo tratamento com DHA e EPA podemos citar: redução de fatores pró-inflamatórios eicosanóides e aumento das resolvinas e protectinas; redução da produção de citocinas; redução da expressão de receptores tirosina-quinase como o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) (ROGERS et al., 2010; RAVACCI et al., 2013); redução da atividade proliferativa (MANNA et al., 2010); aumento da apoptose pela ativação do receptor proteína regulada por glicose 120 (GRP120) (CALDER, 2013b; FABIAN; KIMLER; HURSTING, 2015).

A atividade pró-apoptótica do ácido docosahexaenóico n-3 PUFA (DHA) vem sendo observada em câncer de próstata e em outras células cancerígenas. (SERINI et al., 2011). Os mecanismos de ação desta droga incluem atividade de componentes da superfície celular envolvidas na proliferação celular e nas vias de sobrevivência, isso porque conduz um elevado nível de desordem molecular nas membranas onde ele se integra, induzindo assim alterações profundas nas suas propriedades físico-químicas e na atividade e expressão de proteínas que lá se

encontram (FASANO et al., 2012). Mais especificamente o DHA induz níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e leva ao estresse do RER. Por meio desse estresse, o DHA aumenta a expressão do receptor de morte 5 (DR5) que ativa a cascata de apoptose dependente das caspases 8 e 9 (XIONG et al., 2012).

Além disso, foi observado que o efeito pró-apoptótico do DHA pode estar relacionado com a diminuição na produção e alteração da localização celular do GRP78. Também na via da UPR foi visto que o DHA causa modificações na fosforilação de ERK1/2, fosforilação de PERK, alteração expressão de ERdj5 e ativação da caspase-4 e caspase-7 na indução de apoptose (FASANO et al., 2012). JAKOBSEN et al., em 2008 mostrou que o DHA ativa a UPR e aumenta os níveis de eIF2a fosforilada para tentar manter a homeostase, levando, assim, as células tumorais à apoptose.

O DHA pode afetar a progressão do ciclo celular e induzir a morte de células do hepatocarcinoma humano. O atraso na duração da fase S através da supressão do ciclo celular por meio de proteínas reguladoras de ciclina A, ciclina E e quinase Cdk2 pode explicar, em parte, a redução do crescimento das células tumorais, além de induzir a apoptose devido à indução de estresse no RE (LEE et al., 2010).

Os efeitos do DHA na proteção do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade bucal, ainda não foram avaliados. Além disso, a modulação da via UPR pelo DHA deve ser melhor investigada.

1.6 MODELOS DE CARCINOGENESE

Para compreendermos os mecanismos moleculares de indução e progressão dos tumores, principalmente do câncer bucal, precisamos de modelos que reproduzam este processo, por isso usamos os modelos animais para este fim. Para reproduzir os tumores nos animais, existem os modelos de induções químicas, os tumores transplantados (singênicos), os xenoenxertos, os modelos angiogênicos e metastáticos (MOGNETTI; DI CARLO; BERTA, 2006; SMITH; THOMAS, 2006).

1.6.1 Modelos químicos

O uso de modelos químicos atualmente é o mais utilizado devido a forte associação encontrada entre a carcinogênese e o uso de substâncias como fumo e álcool (SMITH; THOMAS, 2006). As substâncias químicas mais utilizadas são o 4-nitroquinoline1-óxido (4NQO) e o álcool em associação, para uma melhor reprodutibilidade das lesões que acontecem nos humanos no modelo murino (OSEI-SARFO et al., 2013).

O 4NQO é uma destas substâncias com a capacidade de induzir lesões, ele é um carcinógeno sintético solúvel em água, e mimetiza o uso crônico do fumo. As alterações causadas pela exposição desta substância imitam as diferentes fases do câncer bucal em humanos, desde alterações no padrão histológico, até lesões clinicamente visíveis. Microscopicamente, este modelo também simula a progressão tumoral de lesões displásicas até o carcinoma bem diferenciado no modelo animal (PRIME et al., 1986). A indução destas alterações se dá pela capacidade que o 4NQO possui de produzir um metabólito, o 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO) que causa alterações no DNA das células, devido a um forte estresse oxidativo intracelular (TANAKA et al., 2002).

Para tornar esse modelo mais fidedigno ao processo de carcinogênese bucal pode ser utilizado o etanol concomitantemente. A função específica do álcool neste processo ainda não está totalmente esclarecido (OSEI-SARFO et al., 2013). Ele pode funcionar como um solvente, que facilita a absorção de outros compostos cancerígenos, especialmente aqueles encontrados no fumo (HOWIE et al., 2001; SEITZ; STICKEL, 2007). O acetaldeído é um subproduto do etanol, é considerado um composto genotóxico, e atua como um agente cancerígeno em humanos através da indução de mutações, além de promover o intercâmbio de cromátides, interferindo na síntese e reparo do DNA (SEITZ; STICKEL, 2010). Outras possíveis contribuições do etanol à carcinogênese incluem a produção de radicais livres, aumento da produção de estrógenos, alterações no metabolismo do ácido fólico, dano direto pelo etanol ao DNA, deficiências nutricionais e imunológicas (PÖSCHL; SEITZ, 2004; BOFFETTA; HASHIBE, 2006).

O uso do 4NQO e do etanol associados no modelo murino de carcinogênese se mostram úteis na determinação dos passos iniciais que conduzem à transformação

neoplásica na cavidade bucal. A semelhança entre o modelo murino e o ser humano nos possibilita tal comparação. (OSEI-SARFO et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o modelo animal de indução de carcinogênese bucal e verificar o potencial preventivo do ácido docosahexaenóico durante a carcinogênese bucal.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vivo* a indução de lesões bucais a partir da utilização da associação de 4NQO e álcool.
- Avaliar *in vivo* os efeitos do ácido docosahexaenóico durante o processo de carcinogênese.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser submetido no periódico Cancer Prevention Research.

ISSN: 1940-6207, FATOR DE IMPACTO 3.985

RESUMO

O câncer bucal é uma doença multifatorial, mas os principais fatores de risco são fumo e álcool. A carcinogênese se caracteriza pela diminuição da apoptose associada a uma proliferação descontrolada. A via “unfolded protein response” (UPR) desempenha papel importante e super-expressão da proteína GRP78 (reguladora da ativação da UPR) já foi detectada em vários tipos de câncer, associada a pior prognóstico. O ácido Docosahexaenóico (DHA), derivado do Omega 3, surgiu como opção potencialmente preventiva devido à sua atividade pró-apoptótica, e por inibir GRP78. O objetivo deste artigo foi avaliar o efeito do DHA na carcinogênese bucal. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle (Grupo 1), indução de carcinogênese (Grupo 2), indução de carcinogênese associada ao óleo de peixe enriquecido com DHA (Grupo 3). A carcinogênese foi induzida com a aplicação tópica de 4NQO na língua associada à solução alcoólica 15%. O desenvolvimento das lesões foi avaliado durante 8(n=28), 15(n=28) e 24(n=30) semanas, quanto ao tipo, número, área e diagnóstico histopatológico. Em 24 semanas, todos os animais dos grupos 2 e 3 desenvolveram leucoplasias e/ou leucoeritroplasias. Não houve diferença quanto ao número e a área das lesões entre o grupo 2 e o grupo 3. Em 15 semanas, 81,82% e 98,91% dos animais apresentavam alterações epiteliais dos grupos 2 e 3 respectivamente. No tempo de 24 semanas, já foi possível identificar displasias epiteliais em mais de 90% dos animais onde a carcinogênese foi induzida. A administração de óleo de peixe enriquecido em DHA parece não alterar a carcinogênese bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal, Carcinogênese bucal, GRP78, Ácido Docosahexaenóico, Modelo animal.

INTRODUÇÃO

Câncer tem como principal característica o crescimento desordenado e descontrolado de células. Essas por sua vez, invadem os tecidos e órgãos, devido à capacidade de multiplicação e migração que possuem, assim determinando a formação de tumores clinicamente detectáveis (1). A etiologia do câncer de boca é multifatorial, no entanto os principais fatores de risco são hábitos como fumo e consumo de álcool. Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamentos, a taxa de sobrevivência dos pacientes após 5 anos tem-se mantido em, aproximadamente, apenas 50% (2,3) A carcinogênese inicia-se após a célula acumular alterações genéticas suficientes que a façam perder a capacidade de reparo de DNA e indução à apoptose, associado a uma proliferação intensa e descontrolada. O ilimitado potencial replicativo, a autossuficiência sobre os sinais de crescimento e a insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, a evasão da apoptose, a angiogênese, e a invasão de tecidos e metástases, são características-chaves que a célula desenvolve ao se tornar cancerígena (4).

O ácido docosahexaenóico (DHA), cadeia longa de Ômega 3 (Figura 2), faz parte do grupo de ácidos graxos polinsaturados essenciais (PUFAs) que possuem papel importante na estrutura da membrana celular, fluidez, e sinalização celular (5). Ômega-3 e seus derivados são importantes para o desenvolvimento da retina e cérebro, função cognitiva e possuem papel anti-inflamatório pela produção de eicosanóides minimamente inflamatórios e mediadores inibidores de inflamação como protectinas e resolvinas (6).

Estudos apontaram que o DHA é um fator protetor para câncer de mama em humanos (7) e em animais (8). O consumo de DHA e EPA foi associado com redução de recidiva e mortalidade de câncer de mama em mulheres (9). Além disso, demonstrou efeito protetor para câncer de cólon (10) e próstata em modelos animais (11) e *in vitro* (12). Foi observado que o efeito pró-apoptótico do DHA está relacionado com a diminuição na produção e alteração da localização celular do GRP78. Isso porque conduz um elevado nível de desordem molecular nas membranas onde ele se integra, induzindo assim alterações profundas nas suas propriedades físico-químicas e na atividade e expressão de proteínas que lá se encontram (10). Atua também na fosforilação, expressão e ativação de outras

proteínas que fazem parte da via UPR, e na indução de apoptose (10). Também na via da UPR foi visto que o DHA causa modificações na fosforilação de ERK1/2, fosforilação de PERK, alteração expressão de ERdj5 e ativação da caspase-4 e caspase-7 na indução de apoptose (10). JAKOBSEN et al.(13), em 2008 mostrou que o DHA ativa a UPR e aumenta os níveis de eIF2a(fator iniciador da tradução 2a eucariótico) fosforilada para tentar manter a homeostase, levando, assim, as células tumorais à apoptose.

A proteína GRP78 (proteína regulada por glicose 78), também chamada de BIP (proteína de ligação de imunoglobulinas), funciona como um sinal de retenção no RE. Quando proteínas mal enoveladas se acumulam abundantemente no interior do RE, as chaperonas se ligam a elas. Porém a função da GRP78 não é realizar o enovelamento das proteínas, mas mantê-las no RE num estado favorável ao enovelamento. (14). A super-expressão de GRP78 foi vista em vários tipos de câncer, e um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico foram observados no câncer da próstata que super-expressam esta proteína. A presença desta proteína é um marcador da via UPR nas células (15).

A UPR é uma via de transdução de sinal que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvos, envolvidos na manutenção da homeostase celular, por meio dos processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte proteico (16,17). A UPR apresenta dupla função, em um primeiro momento, ela atenua os danos associados com o estresse do RE, porém se isso não for possível, ou suficiente, ela ativa a apoptose da célula (18).

Os efeitos do DHA na proteção do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço ainda não foram avaliados. Além disso, a modulação da via UPR pelo DHA deve ser melhor investigada.

METODOLOGIA

Considerações éticas

Os procedimentos propostos na pesquisa científica em animais que foram realizados neste projeto, nº 170065 estão de acordo com as normas propostas pelo

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) por meio da Lei Federal 11.794/2008, Resolução Normativa nº 30/2016 e Diretriz Brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA). Para a eutanásia dos animais o presente projeto seguiu as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) por meio da Lei Federal 11.794/2008, Resolução normativa nº 13 e Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho de Ética de Uso de Animais (CEUA/HCPA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Local de realização do projeto

Os animais foram mantidos e os experimentos realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. A instituição executora da pesquisa é a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O conjunto dos experimentos desta pesquisa foi realizado também no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Procedimentos experimentais - Modelo Animal

O desenho experimental foi do tipo randomizado prospectivo controlado em modelo animal. Foram utilizados para o estudo 86 ratos wistar machos com idade de aproximadamente 60 dias, pesando aproximadamente 200g. Os animais foram adquiridos de fornecedores credenciados junto ao HCPA. Após, foram alojados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) onde passaram por um período de aclimação/quarentena de 15 dias antes do início dos procedimentos. Sendo mantidos em alojamento específico para a espécie, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar em 40-60%, ciclo de luz de 12 h claro/12 h escuro, sistema de exaustão de ar em caixas moradia com no mínimo 2 e no máximo 4 animais e receberão ração padrão para a espécie e água *ad libitum*. A frequência de troca das caixas seguiu a rotina da UEA.

Característica da amostra

Randomização

Os animais foram alocados randomicamente para seus respectivos grupos experimentais distribuídos considerando o peso ponderal a partir de extratos rerepresentados pelos quartis de peso.

Constituição dos Grupos Experimentais

Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados, randomizados e agrupados conforme os grupos experimentais. Os animais foram identificados com uma marcação no rabo (numeração e cor) com caneta permanente, as caixas foram identificadas de acordo com o grupo experimental.

Neste estudo, os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais, grupo 1, controle, o qual a carcinogênese não foi induzida; grupo 2, em que a carcinogênese foi induzida através da aplicação tópica do 4NQO e álcool 15% diluído na bebida dos animais e por último, o grupo 3, o qual a carcinogênese foi induzida e recebeu por meio da gavagem óleo de peixe enriquecido com DHA. Os grupos foram avaliados em três tempos experimentais diferentes de 8(n=28), 15(n=28) e 24(n=30) semanas.

O cálculo amostral foi baseado considerando o nível de significância de 5%, para um estudo com poder de 80%, uma diferença esperada proporcional de 0.75 entre grupo teste e controle, numa razão de 0.5 entre os grupos. Assim a amostra foi composta por 6 animais no grupo controle e 11 animais nos grupos testes. Nos grupos testes no tempo experimental de 24 semanas, utilizamos 10% de animais a mais, devido a maior chance de perda (mortalidade) em decorrência do maior tempo experimental (23).

Indução da carcinogênese

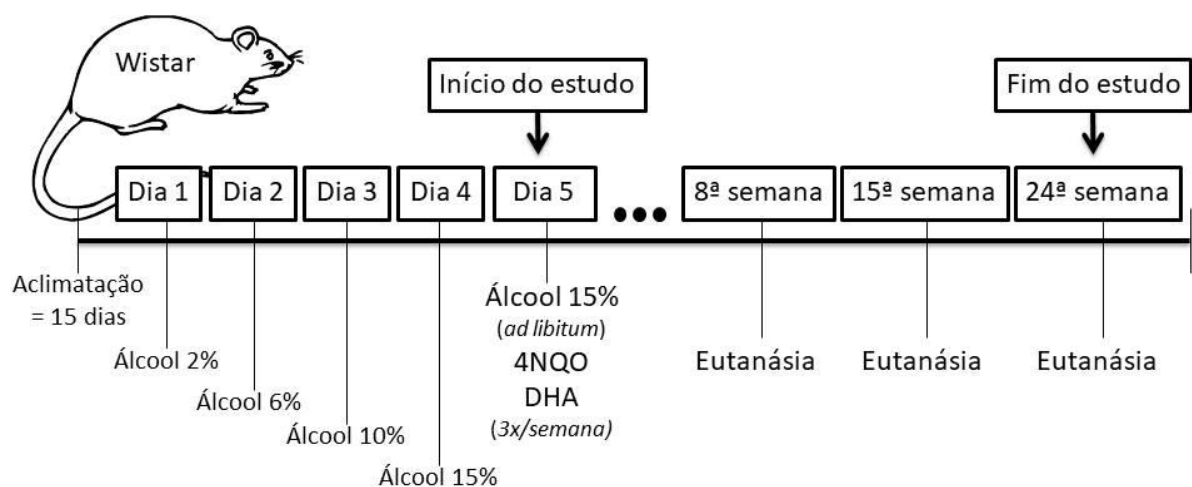
Foi realizada a indução da carcinogênese através de substâncias químicas álcool e 4NQO, a administração está demonstrada na figura 1.

Após a ambientação dos animais, a fase de adaptação da ingestão alcoólica foi iniciada e administradas as concentrações de 2%, 6%, 10%, e então 15% (diluído em água), durante um período de um dia para cada concentração (24,25). Desde o início da adaptação os animais tiveram acesso apenas à ingestão das soluções alcoólicas nas diferentes concentrações. Após o término da adaptação, os animais tiveram acesso apenas à solução alcoólica 15%.

Para a aplicação os animais serão sedados com um anestésico inalatório (Isoflurano), para facilitar a manipulação dos mesmos. Os grupos experimentais receberam a aplicação do 4NQO (Sigma, USA) diluído a 0,5% em propilenoglicol, com auxílio de um microbrush individual e descartável, na língua, três vezes por semana durante o tempo experimental. Enquanto no grupo controle foi aplicado somente o propilenoglicol nas mesmas condições do grupo caso.

O frasco contendo a solução esteve envolvido por papel alumínio para evitar a exposição do 4NQO à luz e mantido a 4°C. Após cada aplicação os animais foram privados de água, solução alcoólica e dieta por 2 horas (para permitir maior tempo de contato do carcinógeno químico com a mucosa bucal (26).

Figura 1. Linha do tempo representando tempos experimentais



Tratamento com DHA

Os animais do grupo teste, que foram tratados com óleo de peixe enriquecido com DHA, receberam 240mg/Kg (27) da substância, via gavagem, três vezes por semana. Visto que o volume total administrado por gavagem é de 10ml/kg, o total com base no peso médio dos animais (200g) será de 2ml por animal. Nesse volume foi diluído 4,8mg de óleo.

Protocolo anestésico para as manipulações

Para avaliação clínica e administração de 4NQO os animais foram anestesiados com isoflurano aproximadamente 5% para indução e 2-3% para manutenção, vaporizado em oxigênio 100%, em fluxo de 0,5L/min, por via inalatória.

Grau de severidade do estudo

Considerando o GUIA DE SEVERIDADE DOS PROCEDIMENTOS CIENTÍFICOS do CEUA-UFRGS, este estudo se enquadrou no grau severo, onde realizamos administração via gavagem nos animais, e a indução química de tumor (28).

Peso Corporal os Animais

Para a pesagem semanal dos animais foi utilizada balança eletrônica e os dados foram anotados em gramas (g) de peso corporal. Esse é um indicador de saúde geral dos animais, visto que os animais expostos aos carcinógenos podem sofrer alterações de peso.

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada via punção cardíaca anteriormente a eutanásia mediante anestesia geral. O animal é posicionado em decúbito dorsal e após estar em plano cirúrgico é realizada a antissepsia da pele com álcool 70%. A inserção da agulha é realizada pelo lado esquerdo do tórax entre o 3º e 5º espaço intercostal ou no ponto onde o choque precordial (batimento cardíaco) é forte e facilmente detectável com as pontas dos dedos.

Foram utilizadas agulhas com calibres entre 21 e 23G acopladas às seringas de 3 ou 5 ml. O volume coletado por rato foi de 5ml. A partir da coleta, foram avaliados os níveis totais de triglicerídeos, níveis totais de colesterol, colesterol HDL e LDL.

Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados nos tempos experimentais referentes a cada grupo. A eutanásia foi executada por sobredose de anestésico, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (2013), através de sobredose anestésica com isoflurano vaporizado em oxigênio 100%, em fluxo de 0,5L/min. por via inalatória até 10 minutos após a verificação de parada cardiorrespiratória. A confirmação da morte foi dada pela verificação dos seguintes sinais: ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal. A execução da técnica e a confirmação da morte foi realizada por um profissional qualificado para esse fim e, após as línguas foram removidas.

Avaliação clínica dos Animais

A avaliação bucal foi realizada nos animais semanalmente, a fim de verificar a ocorrência de lesões. As lesões encontradas foram classificadas em mancha, placa, nódulo, úlcera ou erosão. As línguas foram fotografadas após a eutanásia e as lesões foram classificadas em placa branca, mancha branca e leucoeritroplasia. As imagens fotográficas foram padronizadas quanto à distância e foi utilizado uma régua de 4 cm no momento da captura a fim de estabelecer uma escala. As áreas das lesões foram mensuradas utilizando o software ImageJ, circundando a lesão por meio da opção de mão-livre e os valores expressos em mm².

Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais e análise clínica, as línguas foram imersas em solução de paraformalina 4% para fixação e posterior processamento. Foram realizados cortes histológicos de 3µm para coloração de hematoxilina e eosina (HE). A partir da análise histopatológica, os espécimes foram classificados em: sem alterações, hiperplasia epitelial, hiperkeratose, displasia epitelial (2). Além disso, as

displasias epiteliais foram classificadas segundo a OMS (29) e sistema binário (30). A frequência de cada tipo de lesão foi registrada para cada grupo. No grupo controle, a mucosa da borda da língua foi utilizada como referência para análise histopatológica.

Análise de dados e análise estatística

Os dados do presente estudo foram computados no Programa de Computador SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences) a fim de fazer a análise estatística. Foi testada a normalidade da distribuição dos dados obtidos para escolha do teste mais adequado. Quando houve normalidade da distribuição dos dados, os grupos foram comparados por uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste *Post Hoc* de Tukey, e os dados apresentados na forma de média e desvio padrão. Se não constatada a normalidade da distribuição dos dados, os grupos foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *Post Hoc* de Dunns, e os dados apresentados na forma de mediana e intervalos interquartis. Foi considerado um nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Os animais foram pesados semanalmente até o fim dos seus respectivos tempos experimentais. O peso inicial médio foi de 343g. A partir da segunda semana os ratos do grupo controle tiveram uma média de peso maior que o grupo 2 e do grupo 3, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Essa diferença se estendeu até a 7^o semana, quando os pesos se tornaram similares novamente (Figura 2). Ao longo de todo o período experimental não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA de duas vias, $p > 0.05$).

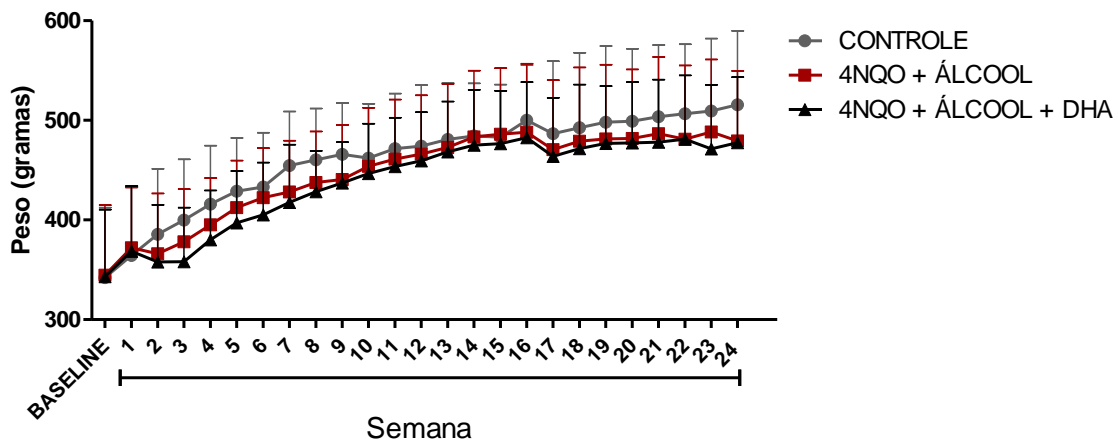


Figura 2. Variação do peso dos animais (gramas) ao longo do estudo.

O consumo de ração e de líquidos também foi monitorado semanalmente. Detectamos que o grupo controle consumiu maior quantidade de ração e de líquidos (Tabela 1) ($p > 0.05$).

Tabela 1. Média e Desvio-padrão do consumo semanal de ração e líquidos por caixa de animal de acordo com o grupo.

Consumo médio semanal	Controle (grupo 1)	4NQO + Álcool (grupo 2)	4NQO + Álcool + DHA (grupo 3)	p (ANOVA)
Ração por caixa (gramas)	307.61 (± 37.27) a	205.39 (± 30.66) b	179.11 (± 35.01) b	$p < 0.001$
Líquidos por caixa (mililitros)	540.06 (± 76.82) a	308.14 (± 76.56) b	281.45 (± 70.81) b	$p = 0.0002$

Previamente à eutanásia, por meio de punção cardíaca, foi coletado sangue total dos animais. Observamos menor nível de colesterol total no grupo 3 em relação ao 1 no tempo de 8 semanas, porém nos tempos experimentais posteriores não houve diferença entre os grupos (Figura 3A). Em relação ao colesterol HDL não houve diferença em nenhum tempo avaliado (Figura 3B). Observamos aumento dos níveis de triglicerídeos no tempo intermediário (15 semanas), mas que retornou a valores semelhantes na última coleta (Figura 3C).

No momento da eutanásia foram realizadas fotografias das línguas e a presença das lesões foi avaliada (Figura 4). No tempo experimental de 8 semanas,

nenhuma lesão foi detectada. Em 15 semanas, duas placas brancas foram observadas, uma no grupo 2 e outra no grupo 3, ambas em dorso posterior de língua. Em 24 semanas, todos os animais dos grupos 2 e 3 apresentavam lesões brancas ou leucoeritroplásicas. As lesões brancas eram localizadas em sua maioria no dorso da língua e as lesões leucoeritroplásicas em borda de língua (Tabela 2). Nenhum animal do grupo controle apresentou lesão em nenhum dos tempos experimentais avaliados.

Microscopicamente (Figura 5), em 8 semanas em torno de 45% e 63% dos animais dos grupos 2 e 3, respectivamente já apresentam alterações epiteliais, sendo essas em sua maioria de Hiperkeratose. Em 15 semanas, 81% e 91% dos animais dos grupos 2 e 3, respectivamente apresentam alterações epiteliais, na maioria Hiperkeratose isolada ou associada à Hiperplasia Epitelial. Em 24 semanas, 100% e 91,66% dos animais dos grupos 2 e 3, respectivamente apresentavam displasia epitelial (Tabela 3).

Na análise de subclassificação das displasias epiteliais, no tempo de 15 semanas, a maioria das displasias foi classificada como leves ou de baixo grau. Em 24 semanas, observamos maior severidade das lesões no grupo 2, onde a maioria das displasias foi classificada como de alto grau (Tabela 4).

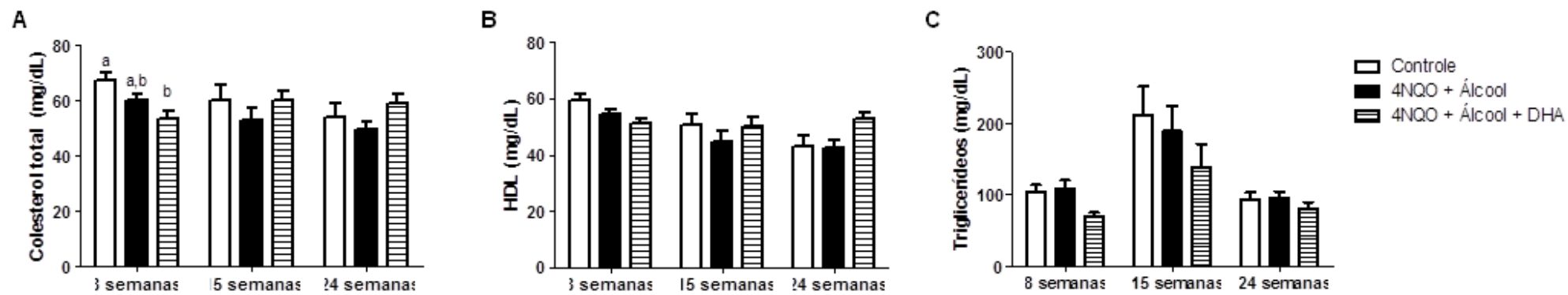


Figura 3. Níveis de colesterol total (A), HDL (B) e triglicerídeos (C) do sangue coletado nos diferentes tempos experimentais.

Tabela 2. Número e área média dos diferentes tipos de lesões observadas de acordo com os grupos. p, Teste t.

	15 semanas				24 semanas				p (TESTE t)
	Álcool+4NQO N=11		Álcool+4NQO+DHA N=11		Álcool+4NQO N=12		Álcool+4NQO+DHA N=12		
	N	Área (mm ²)	N	Área (mm ²)	N	Área (mm ²)	N	Área (mm ²)	
Sem alterações	10	-	10	-	0	-	0	-	
Mancha Branca	0	-	0	-	14	0,057 (±0,033)	15	0,064 (±0,049)	0,6808
Placa Branca	1	0,13	1	0,33	11	0,215 (±0,15)	10	0,133 (±0,08)	0,1528
Leucoeritroplasia	0	-	0	-	11	2,089 (±0,58)	11	2,191 (±0,44)	0,6417

Figura 4. Imagens representativas das línguas dos animais do tempo experimental de 24 semanas. A, grupo controle sem lesão clinicamente visível. B, grupo álcool+4NQO com placa branca em dorso de língua. C, grupo álcool+4NQO com leucoeritroplasia em borda lateral direita de língua.



Tabela 3. Diagnóstico histopatológico das línguas dos animais de acordo com o grupo e com o tempo experimental.

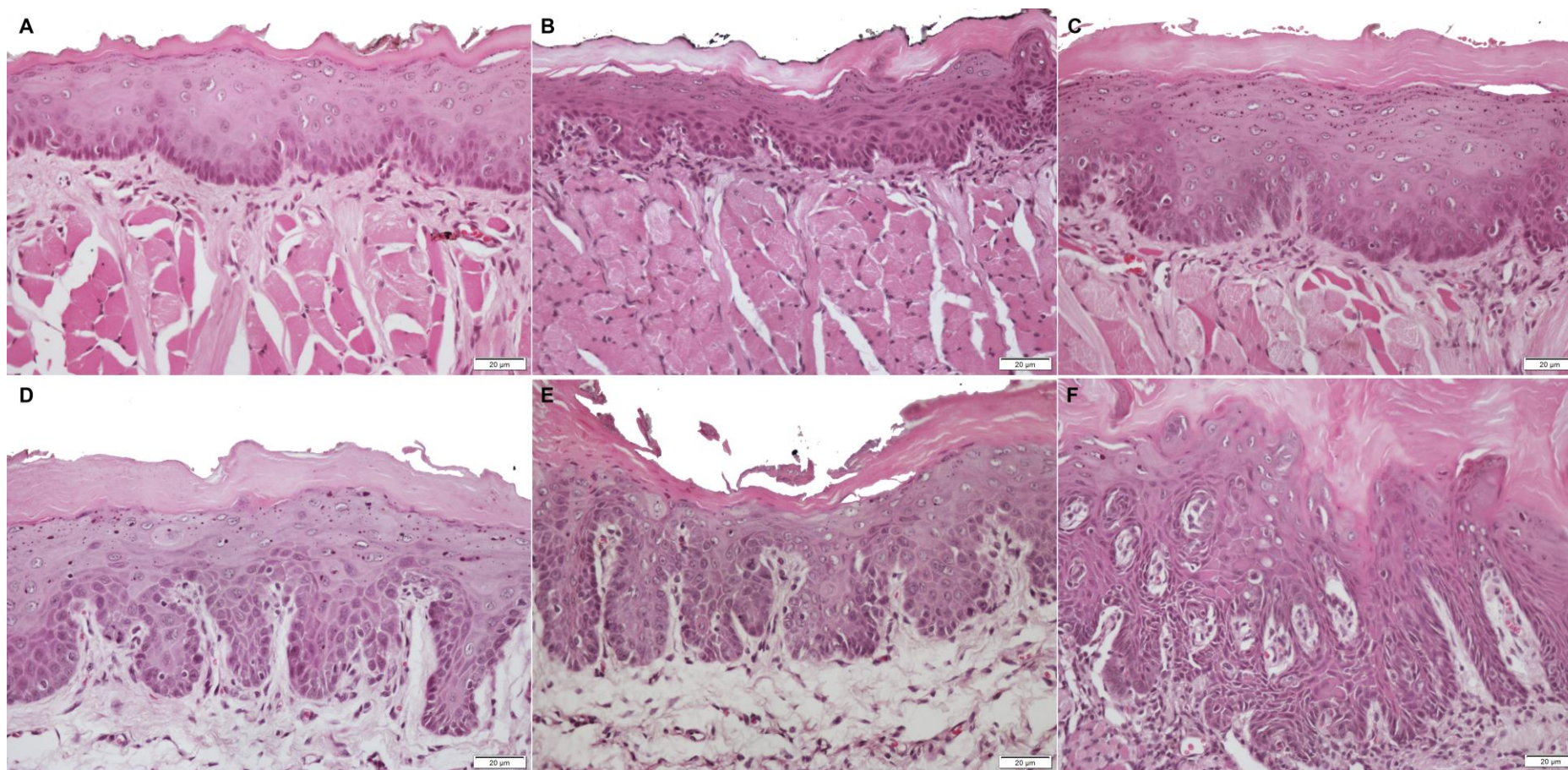
	8 semanas			15 semanas			24 semanas			30
	Controle N=6	Álcool+4NQO N=11	Álcool+4NQO+ DHA N=11	Controle N=6	Álcool+4NQO N=11	Álcool+4NQO+ DHA N=11	Controle N=6	Álcool+4NQO N=12	Álcool+4 DH. N=12	
Sem alterações	6 (100%)	6 (54,54%)	4 (36,36%)	6 (100%)	2 (18,18%)	1 (9,09%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Hiperplasia epitelial	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Hiperkeratose	0 (0%)	3 (27,27%)	7 (63,63%)	0 (0%)	1 (9,09%)	5 (45,45%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
HP+HC	0 (0%)	2 (18,18%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (54,54%)	1 (9,09%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	
Displasia epitelial	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (18,18%)	4 (36,36%)	0 (0%)	12 (100%)	11 (91,66%)	

HP+HC (Hiperplasia epitelial associado à Hiperkeratose)

Tabela 4. Subclassificação das displasias epiteliais de acordo com o grupo e com o tempo experimental.

		15 semanas		24 semanas	
		Álcool+4NQO N=11	Álcool+4NQO+DHA N=11	Álcool+4NQO N=12	Álcool+4NQO+DHA N=12
OMS	Leve	2 (18,18%)	3 (27,27%)	1 (8,33%)	4 (33,33%)
	Moderada	0 (0%)	1 (9,09%)	8 (66,66%)	3 (25%)
	Severa	0 (0%)	0 (0%)	3 (25%)	4 (33,33%)
Sistema Binário	Baixo	2 (18,18%)	3 (27,27%)	2 (16,66%)	6 (50%)
	Alto	0 (0%)	1 (9,09%)	10 (83,33%)	5 (41,66%)

Figura 5. Imagens microscópicas representativas das línguas dos animais do tempo experimental de 24 semanas. A, sem alterações. B, hiperkeratose. C, hiperkeratose e hiperplasia epitelial. D, displasia epitelial leve. E, displasia epitelial moderada. F, displasia epitelial severa.



DISCUSSÃO

O consumo elevado de ômega 3 e seus derivados, especialmente o DHA, é considerado uma fator de proteção ao desenvolvimento de câncer, no entanto seu efeito na carcinogênese bucal é desconhecido. Ao final deste estudo, tanto o grupo 2 quanto o 3 apresentavam em sua maioria a presença de displasia no epitélio lingual exposto ao carcinógenos 4-NQO e à solução alcóolica, 100% e 91,66% respectivamente. Apesar de uma maior quantidade de lesões de alto grau no grupo 2 não é possível estabelecer um efeito protetor para o consumo de óleo de peixe rico em DHA na carcinogênese bucal. Ainda que os efeitos do consumo de ômega 3 e seus derivados tenham sido amplamente explorados na carcinogênese mamária é a primeira vez que o efeito do DHA na carcinogênese bucal está sendo estudado.

Uma meta-análise recente concluiu que a redução do risco de câncer de mama em humanos é dose-dependente do consumo de EPA e DHA, sendo que o consumo de 100mg por dia reduz o risco em 5% e 300mg por dia reduz em até 14%(31). No entanto, os efeitos não são independentes de outros fatores da dieta. Outra meta-análise detectou que aumentar a razão de omega3/omega6 na dieta em um décimo, reduz o risco entre 6-38% em indivíduos norte-americanos com alto consumo de PUFAs(32).

Dessa forma, pode-se sugerir que tanto o consumo aumentado de ômega 3, quanto a sua razão em relação ao ômega 6 é importante para resultar em uma redução do risco de câncer de mama. O ômega 6 absorvido na dieta inibe o alongamento e dessaturação do ômega 3 em EPA e DHA. Além disso, eicasanóides de ômega 3 e 6 competem pelas mesmas enzimas, pois estão envolvidas em seu metabolismo. Assim, uma redução adicional no consumo de ômega 6 seria necessário para efetivamente reduzir os risco de desenvolver câncer (17,33). No nosso estudo não foi possível comparar a razão entre ômega 3 e ômega 6 nos diferentes grupos.

No entanto, o papel do consumo de óleo de peixe *in vitro* ainda é contraditório. Uma recente revisão de literatura sobre estudos com modelos animais

para determinar o efeito do óleo de peixe na carcinogênese mamária identificou 24 estudos, sendo que 18 mostraram um papel protetor, 2 não observaram diferenças entre os grupos analisados e 4 identificaram que o óleo de peixe promoveu a carcinogênese (17). Como mencionado anteriormente outros fatores da dieta podem contribuir para esses achados controversos, tanto promoção quanto inibição da carcinogênese foram observadas em estudos com uma razão de ômega3/ômega6 entre 0.33 a 0.5, dependendo do consumo total de lipídeos. A promoção da carcinogênese foi observada em dietas onde 39% das calorias eram oriundas de lipídeos e inibição em dietas com pouca gordura, onde apenas 16% das calorias eram oriundas de lipídeos (34).

Outros fatores de confusão também foram identificados entre os trabalhos. Entre eles, a origem do ômega 3, que pode ser a partir de compostos purificados, óleo de peixe, óleo de sardinha ou de fígado de bacalhau, pois os níveis de ácidos graxos variam entre as espécies (17). Outro fator importante é o momento em que a suplementação é realizada, existe evidência a partir de estudos epidemiológicos em humanos que mudanças dietéticas precoces influenciam mais o risco de desenvolver câncer de mama (34). No nosso estudo, a suplementação com óleo de peixe iniciou juntamente com a indução da carcinogênese, sendo necessária a realização de mais estudos com outros protocolos de administração.

Sendo este o primeiro estudo dos efeitos do DHA na carcinogênese bucal, não podemos comparar nossos achados diretamente. Podemos sugerir que os efeitos do consumo de óleo de peixe rico em DHA na carcinogênese podem ser específicos dependendo do tipo de tumor. Enquanto que no câncer de boca, os principais fatores de risco são o consumo de fumo e álcool, no câncer de mama, além destes fatores, questões endócrinas (níveis hormonais de estrógenos), hereditárias, sobrepeso e obesidade possuem um papel principal (1). Assim, os efeitos protetores do ômega 3 e do DHA podem depender também dos fatores etiológicos que induzem a carcinogênese.

Em relação ao modelo de carcinogênese utilizado, no nosso estudo as lesões leucoeritroplásicas e lesões brancas surgiram a partir da 15^o semana e ao final do

estudo, após 24 semanas todos os animais submetidos à aplicação tópica de 4NQO apresentavam lesões brancas e ou vermelhas. Barcessat et al.(35), utilizou um modelo semelhante de aplicação tópica de 4NQO e observou lesões brancas a partir da 16^o semana, porém neste estudo não havia a ingestão de solução alcóolica. Henriques et al.(26), no entanto detectou lesões já em 12 semanas, essa diferença pode ser devido à frequência de aplicação tópica de 4NQO que foi 4 vezes semanais no estudo citado e 3 vezes neste estudo. Dessa forma, podemos inferir que o surgimento de lesões apresenta uma relação direta com a frequência de aplicação do carcinógeno.

Em 8 semanas, apesar de não haver lesões clinicamente visíveis já observamos microscopicamente alterações epiteliais. Este achado está de acordo com outros estudos que mostraram alterações epiteliais a partir da 8^o semana.(36,37). Existem evidências que as primeiras alterações morfológicas epiteliais surgem mais precocemente, a partir da 5^o semana, com a presença de hiperkeratose e hiperplasia da camada basal (35).

Após 24 semanas, não observamos o surgimento de carcinomas espinocelulares, apenas displasias epiteliais severas. No entanto, Henriques et al.(26), observaram 1 carcinoma superficialmente invasivo a partir de 4 meses de aplicação tópica do carcinógeno. Novamente podemos inferir que essa diferença em relação ao nosso estudo se deve à maior frequência de aplicação do 4NQO.

Com base nos nossos achados e no que já existe na literatura, podemos inferir que o surgimento do maior número de lesões e grau de severidade é diretamente proporcional ao tempo de aplicação do carcinógeno. No entanto, o tempo utilizado no presente estudo não foi suficiente para estabelecer o surgimento de uma lesão tumoral maligna macroscopicamente e microscopicamente. Estudo prévio relatou que o estabelecimento do tumor ocorre após 7 meses de aplicação tópica de 4NQO(36). Além disso, nosso modelo utilizou álcool 15% diluído na água consumida pelos animais. Com base nos nossos resultados podemos dizer que o álcool não promoveu surgimento precoce das lesões nem maior severidade quando comparados com estudos que não utilizaram álcool na bebida dos animais.(35)

Animais do controle apresentaram um consumo médio de ração e de líquido significativamente maior em relação aos grupos 2 e 3. No entanto, não houve diferença significativa de peso. Isso pode ser explicado pelo fato do álcool presente na água, assim como o óleo de peixe no grupo 3, apresentar um valor calórico compensatório à baixa ingestão de alimentos. Considerando a ingestão de um composto derivado de ácidos graxos polinsaturados, fizemos a análise de componentes presentes no sangue como os níveis de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos. Os níveis de colesterol total, quando avaliados na 8ª semana, apresentaram um nível menor no grupo 3 em relação ao 1. No entanto, não houve diferença nos tempos de 15ª e 24ª semanas. Os níveis de colesterol HDL entre os grupos, ao longo dos três tempos experimentais, não se alterou. Após a análise destas variáveis, podemos sugerir que a ingestão de óleo de peixe rico em DHA parece não prejudicar os níveis séricos desses componentes. Assim, a suplementação alimentar com este derivado de ômega 3 parece ser seguro, no entanto, estudos com maior tempo de acompanhamento são necessários.

CONCLUSÃO

O método de aplicação tópica do 4NQO associado à ingestão de solução alcoólica 15% durante 24 semanas resultou apenas em desordens potencialmente malignas. O óleo de peixe rico em DHA não apresentou efeito na carcinogênese bucal.

REFERÊNCIAS

1. INCA. O que é o câncer? - INCA [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 1]. Available from: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322
2. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010;46:407–10.
3. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther.* 2016;12:458–63.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
5. Calder PC. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol.* 2011;668 Suppl 1:S50-58.
6. Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 1999;83:217–44.
7. Shannon J, King IB, Moshofsky R, Lampe JW, Gao DL, Ray RM, et al. Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1090–7.
8. Signori C, El-Bayoumy K, Russo J, Thompson HJ, Richie JP, Hartman TJ, et al. Chemoprevention of breast cancer by fish oil in preclinical models: trials and tribulations. *Cancer Res.* 2011;71:6091–6.
9. Patterson RE, Flatt SW, Newman VA, Natarajan L, Rock CL, Thomson CA, et al. Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis. *J Nutr.* 2011;141:201–6.
10. Fasano E, Serini S, Piccioni E, Toesca A, Monego G, Cittadini AR, et al. DHA induces apoptosis by altering the expression and cellular location of GRP78 in colon cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822:1762–72.

11. Zhang Z, Garzotto M, Beer TM, Thuillier P, Lieberman S, Mori M, et al. Effects of ω -3 Fatty Acids and Catechins on Fatty Acid Synthase in the Prostate: A Randomized Controlled Trial. *Nutr Cancer*. 2016;1–11.
12. Li C-C, Hou Y-C, Yeh C-L, Yeh S-L. Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Induced by Tumor-Associated Macrophages. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 2016 Sep 27];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055683/>.
13. Jakobsen CH, Størvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, et al. DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res*. 2008; 49:2089-2100.
14. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods San Diego Calif*. 2005;35:373–81.
15. Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, Agellon LB. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front Oncol*. 2015;5:11.
16. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;569:29–63.
17. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519–29.
18. Wang W, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2014;1843:2143–9.
19. Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol*. 1997;2:105–9.
20. McMillen BA, Crawford MS, Kulers CM, Williams HL. Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf*. 2005;40:494–7.

21. Carrard VC, Pires AS, Mendez M, Mattos F, Moreira JCF, Sant'Ana Filho M. Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2009;47:1058–63.
22. Henriques ACG, Cazal C, Lins RC, Castro JFL de. Morphological Analysis of the Oral Mucosa of Rats Subjected to Experimental Carcinogenesis by Administration of Nitroquinoline Oxide (4NQO). *Braz Res Pediatr Dent Integr Clin.* 2011;11:13–20.
23. Parada B, Reis F, Cerejo R, Garrido P, Sereno J, Xavier-Cunha M, et al. Omega-3 fatty acids inhibit tumor growth in a rat model of bladder cancer. *BioMed Res Int.* 2013;2013:368178.
24. CEUA- UFRGS. GUIA DE SEVERIDADE DOS PROCEDIMENTOS CIENTÍFICOS [Internet]. [cited 2016 Nov 24]. Available from: <http://www.ufrgs.br/ceua/docs-e-formularios/guia-de-severidade>
25. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. Head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. Head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005;p.177–80.
26. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Onc.* 2006; 42,:987– 993
27. Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ* 2013; 346:f3706.
28. Yang B, Ren XL, Fu YQ, Gao JL, Li D. Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: a meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies. *BMC Cancer* 2014 ; 14:105.

29. Witte, TR; Hardman, E. The Effects of Omega- 3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption on Mammary Carcinogenesis. *Lipids* 2015; 50:437–446.

30. Olivo SE, Hilakivi-Clarke L. Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:1563–72.

31. Barcessat AR¹, Huang I, Rabelo GD, Rosin FC, Ferreira LG, *et al.* Systemic toxic effects during early phases of topical 4-NQO-induced oral carcinogenesis in rats. *Oral Pathol Med* 2014; 43: 770–777.

32. Dayan D, Kaplan I, Russak S, Bodner L. Dysplastic changes of the palate and tongue mucosa induced by topically applied 4 nitroquinoline-N-oxide (4NQO) in desalivated rats. In: Varma AK, editor. Proceedings of the 5th international congress on oral cancer, Oral oncology, vol. 5. New Delhi: MacMillan India; 1997. p. 514–7.

33. Rich AM, Reade PC. Histomorphometric analysis of epithelial changes in chemically induced oral mucosal carcinogenesis in rats. *J Oral Pathol* 1988;17:528–33.

34. Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006; 42(7):655-67.

4 CONCLUSÃO

O método de aplicação tópica do 4NQO associado à ingestão de solução alcoólica 15% durante 24 semanas resultou apenas em desordens potencialmente malignas. O óleo de peixe rico em DHA não apresentou efeito na carcinogênese bucal.

REFERÊNCIAS

BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **The Lancet Oncology**, London v. 7, no. 2, p. 149–156, Feb. 2006.

BOUGNOUX, P. et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. **British Journal of Cancer**, London, v. 101, no. 12, p. 1978–1985, Dec. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA estima que haverá 596.070 novos casos de câncer em 2016**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2016>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, no. 1, p. 63–69, Mar. 2007.

BROWN, J. M.; GIACCIA, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, no. 7, p. 1408–1416, 1 Apr. 1998.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 668 Suppl 1, p. S50–58, Sept. 2011.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 75, no. 3, p. 645–662, Mar. 2013a.

CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 72, no. 3, p. 326–336, Aug. 2013b.

CARRARD, V. C. et al. Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, Oxford, v. 47, no. 6, p. 1058–1063, June. 2009.

DAYAN, D. et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncology**, Oxford, v. 2, no. 33, p. 105–9, Mar. 1997.

DICKS, N. et al. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 5, p. 11, 2015.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F.; HURSTING, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. **Breast cancer research: BCR**, London, v. 17, p. 62, 2015.

FASANO, E. et al. DHA induces apoptosis by altering the expression and cellular location of GRP78 in colon cancer cell lines. **Biochimica Et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1822, no. 11, p. 1762–1772, Nov. 2012.

FENTON, W. A.; HORWICH, A. L. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. **Quarterly Reviews of Biophysics**, London, v. 36, no. 2, p. 229–256, May 2003.

GIAMPIETRI, C. et al. Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 417281, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 Jan. 2000.

HAZARI, Y. M. et al. Emerging tale of UPR and cancer: an essentiality for malignancy. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, Thousand Oaks, Sept. 2016.

HENRIQUES, A. C. G. et al. Morphological Analysis of the Oral Mucosa of Rats Subjected to Experimental Carcinogenesis by Administration of Nitroquinoline Oxide (4NQO). **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**, v. 11, no. 1, p. 13–20, July. 2011.

HOWIE, N. M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Diseases**, v. 7, no. 6, p. 349–354, Nov. 2001.

HUANG, T.-T. et al. Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, v. 109, no. 5, p. 326–337, May, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é o câncer? - INCA**. Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 1 ago. 2016.

JAIN, A. et al. Oncoapoptotic markers in oral cancer: prognostics and therapeutic perspective. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 18, no. 5, p. 483–494, Oct. 2014.

JAKOBSEN, C. H. et al. DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. **Journal of Lipid Research**, v. 49, no. 10, p. 2089–2100, Oct. 2008.

KAPLAN, I.; HOCHSTADT, T.; DAYAN, D. PCNA en lesiones displásicas de la mucosa de la lengua y del paladar inducidas por aplicación tópica de 4NQO en ratas desalivadas. **Medicina Oral**, v. 7, no. 5, p. 336–343, 2002.

KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, no. 10, p. 1389–1398, 15 Nov. 2002.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, no. 2, p. 458–463, June 2016.

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 35, no. 4, p. 373–381, Apr. 2005.

LEE, C. Y.-K. et al. The cell cycle effects of docosahexaenoic acid on human metastatic hepatocellular carcinoma proliferation. **International Journal of Oncology**, v. 36, no. 4, p. 991–998, Apr. 2010.

LI, C.-C. et al. Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Induced by Tumor-Associated Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, no. 6, 12 June 2014.

LIN, C.-Y. et al. Positive association of glucose-regulated protein 78 during oral cancer progression and the prognostic value in oral precancerous lesions. **Head & Neck**, v. 32, no. 8, p. 1028–1039, Aug. 2010.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, no. 6, p. 716–731, Dec. 2007.

MANNA, S. et al. Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER-2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 29, no. 4, p. 531–537, Aug. 2010.

MCMILLEN, B. A. et al. Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 40, no. 6, p. 494–497, Dec. 2005.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncology**, v. 42, no. 5, p. 448–460, May 2006.

NAGELKERKE, A. et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. **Breast Cancer Research**, v. 15, p. R2, 2013.

- OSEI-SARFO, K. et al. The molecular features of tongue epithelium treated with the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide and alcohol as a model for HNSCC. **Carcinogenesis**, v. 34, no. 11, p. 2673–2681, Nov. 2013.
- PARADA, B. et al. Omega-3 fatty acids inhibit tumor growth in a rat model of bladder cancer. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 368178, 2013.
- PARK, H.-R. et al. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, no. 17, p. 1300–1310, 1 Sept. 2004.
- PATTERSON, R. E. et al. Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis. **The Journal of Nutrition**, v. 141, no. 2, p. 201–206, Feb. 2011.
- PEREIRA, M. C. et al. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. **Journal-canadian dental association**, Ottawa, v.73, no.4, p.339-344, May 2007.
- PÖSCHL, G.; SEITZ, H. K. Alcohol and cancer. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 39, n. 3, p. 155–165, June 2004.
- PRIME, S. S. et al. Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, no. 5, p. 280–283, May 1986.
- RAVACCI, G. R. et al. Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, no. 3, p. 505–515, Mar. 2013.
- ROGERS, K. R. et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. **Carcinogenesis**, v. 31, no. 9, p. 1523–1530, Sept. 2010.
- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, no. 7, p. 519–529, July 2007.
- ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, no. 3, p. 217–244, Sept. 1999.
- RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, no. 6, p. 937–946, 15 Mar. 2009.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, no. 10, p. 469–476, Oct. 2007.

SAIBIL, H. R. Chaperone machines in action. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, no. 1, p. 35–42, Feb. 2008.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**, v. 569, no. 1-2, p. 29–63, Jan. 2005.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, no. 8, p. 599–612, Aug. 2007.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. **Genes & Nutrition**, v. 5, no. 2, p. 121–128, June 2010.

SERINI, S.; et al. Differential anti-cancer effects of purified EPA and DHA and possible mechanism involved. Cambridge. **Curr. Med. Chem.** V.18. no. 26. p. 4065-4075. Sept. 2011

SHANNON, J. et al. Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, no. 4, p. 1090–1097, Apr. 2007.

SIDHU, A. et al. Borrelidin Induces the Unfolded Protein Response in Oral Cancer Cells and Chop-Dependent Apoptosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, no. 11, p. 1122–1127, Nov. 2015.

SIGNORI, C. et al. Chemoprevention of breast cancer by fish oil in preclinical models: trials and tribulations. **Cancer Research**, v. 71, n. 19, p. 6091–6096, Oct. 2011.

SLOTTA-HUSPENINA, J. et al. Evidence of Prognostic Relevant Expression Profiles of Heat-Shock Proteins and Glucose-Regulated Proteins in Oesophageal Adenocarcinomas. **PLoS ONE**, v. 7, no. 7, 24 July 2012.

SMITH, L. P.; THOMAS, G. R. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: A historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of transplanted xenogeneic human tumors. **International Journal of Cancer**, v. 118, no. 9, p. 2111–2122, May 2006.

SZEGEZDI, E. et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO reports**, v. 7, no. 9, p. 880–885, Sept. 2006.

TANAKA, T. et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 23, no. 8, p. 1361–1367, Aug. 2002.

TU, B. P.; WEISSMAN, J. S. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. **Molecular Cell**, v. 10, no. 5, p. 983–994, Nov. 2002.

VISIOLI, F. et al. Glucose-regulated protein 78(grp78) confers chemoresistance tumor endothelial cells under acidic stress. **PLoS One**. San Francisco. v. 6, no. 9. June. 2014.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. **Nature Reviews. Cancer**, v. 14, no. 9, p. 581–597, Sept. 2014.

WANG, W.; GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. v. 1843, no. 10, p. 2143–2149, Oct. 2014.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncology**, Oral Healthcare for People Living with Oral Cancer. v. 46, n. 6, p. 407–410, June. 2010.

XIONG, A. et al. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, no. 6, p. 923–934, June. 2012.

ZHANG, Z. et al. Effects of ω -3 Fatty Acids and Catechins on Fatty Acid Synthase in the Prostate: A Randomized Controlled Trial. **Nutrition and Cancer**, p. 1–11, Sept. 2016.

ANEXO A - Aprovação pela comissão de ética no uso de animais



GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 170065

Data de Aprovação do Projeto: 31/03/2017

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA VIA α UNFOLDED PROTEIN RESPONSE β E O EFEITO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA CARCINOGENESE BUCAL

Data de Término: 20/12/2019

Pesquisador Responsável: VINICIUS COELHO CARRARD

Equipe de pesquisa:

ARTHUR PIAS SALGUEIRO
FERNANDA VISIOLI
TAIANE BERGUEMAIER DE LIMA

BIANCA DE BEM PRUNES
IAN SANTANA MACHADO

EDUARDO LIBERATO DA SILVA
ISADORA FOLLAK DE SOUZA

EWELYN DE FREITAS FARIAS
JÚLIA SILVEIRA NUNES

Submissão	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
15/03/2017	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	M/60dias	88	28/03/2017	APROVADO
01/09/2017	EMENDA		/	0	12/09/2017	APROVADO
Total de Animais:				88		

Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.