

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

VAGNER JONATAN SOSTER

ANÁLISE DE DOSAGENS DE INTERLEUCINA-6 (IL-6) E DE LEUCÓCITOS  
EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DE CÂNCER DE LÍNGUA E  
DOENÇA PERIODONTAL.

Porto Alegre

2015

VAGNER JONATAN SOSTER

ANÁLISE DE DOSAGENS DE INTERLEUCINA-6 (IL-6) E DE LEUCÓCITOS  
EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DE CÂNCER DE LÍNGUA E  
DOENÇA PERIODONTAL.

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

Orientador: Prof. Dr. Cassiano  
Kuchenbecker Rösing  
Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Cavagni

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Soster, Vagner Jonatan  
ANÁLISE DE DOSAGENS DE INTERLEUCINA-6 (IL-6) E DE  
LEUCÓCITOS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DE  
CÂNCER DE LÍNGUA E DOENÇA PERIODONTAL. / Vagner  
Jonatan Soster. -- 2015.  
24 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.  
Coorientador: Juliano Cavagni.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,  
BR-RS, 2015.

1. Interleucina 6. 2. Doença periodontal. 3. Câncer  
de Língua. 4. Leucocitos. I. Rösing, Cassiano  
Kuchenbecker, orient. II. Cavagni, Juliano,  
coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer imensamente aos meus pais pelo apoio incondicional, incentivo, amor e paciência em todos os anos durante a minha formação

Ao meu orientador, pelos ensinamentos, paciência frente certas dificuldades encontradas e por ter me dado a oportunidade de entrar para o programa de iniciação científica desde muito cedo na minha formação.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a possibilidade de uma formação de qualidade.

Todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar ao encerramento desta etapa da minha formação como cirurgião dentista, quero aqui deixar meu muito obrigado.

## RESUMO

SOSTER, Vagner Jonatan. **Análise de dosagens de Interleucina-6 (IL-6) e de leucócitos em ratos Wistar submetidos a indução de câncer de língua e doença periodontal.** 2015. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O objetivo desse estudo foi avaliar as dosagens de IL-6 e contagens de leucócitos no sangue de ratos Wistar expostos a indução de doença periodontal e câncer de língua. O estudo contou com ratos Wistar machos com 60 dias de vida foram divididos em cinco grupos: Grupo Controle, no qual os animais não foram expostos a procedimentos experimentais; Grupo Doença Periodontal, que foi submetido a indução de doença periodontal através de ligadura por 140 dias; Grupo Câncer de Língua, no qual os animais foram expostos a desenvolvimento experimental de câncer através do uso de carcinógeno 4NQO por 140 dias; Grupo Câncer de Língua + Doença Periodontal, nesse grupo os animais sofreram inicialmente indução de câncer através do 4NQO por 140 dias e após indução de doença periodontal por ligadura por 14 dias; Grupo Doença Periodontal + Câncer de Língua, nesse grupo os animais foram induzidos inicialmente a desenvolver somente doença periodontal por 14 dias e após também receberam 4NQO por 140 dias. Os animais foram mortos ao término do experimento, e as peças anatômicas como língua, maxilares além do sangue armazenadas para avaliação. Contagem de leucócitos foi realizada a partir de esfregaços de sangue e dosagem de IL-6 foi realizada por ELISA. Para essa análise, material oriundo de 5 animais por grupo, randomicamente selecionados foi utilizado. Os resultados foram comparados entre os grupos através dos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis. Todos os animais expostos ao 4NQO desenvolveram alterações neoplásicas na língua. Em relação aos leucócitos, observa-se maior dosagem de linfócitos nos animais que sofreram indução de doença periodontal. No que diz respeito aos monócitos, os animais que foram submetidos a indução de doença periodontal apresentaram menores quantidades; em contrapartida, os neutrófilos foram encontrados em números maiores nos animais expostos ao carcinógeno 4NQO. As dosagens de IL-6 não diferiram estatisticamente entre os grupos. As combinações de exposições a carcinógeno 4NQO e inflamação periodontal não afetam dosagens de IL-6 e modulam a expressão de leucócitos sanguíneos.

Palavras-chave: Interleucina 6. Doença periodontal. Câncer de língua. Leucocitos.

## ABSTRACT

SOSTER, Vagner Jonatan. **Analysis of interleukin -6 (IL-6) e and leucocytes in wistar rats submitted to induced tongue cancer and periodontal disease**. 2015. 24 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

The aim of this study was to evaluate the IL-6 dosages and serum leukocyte counts in Wistar rats exposed to experimental periodontal disease and tongue cancer. Male Wistar rats 60 days old were divided in 5 groups: Control group, in which animals were not submitted to any experimental procedure; Group Periodontal Disease, submitted to ligature-induced periodontal disease during 140 days; Group Tongue Cancer, exposed to experimental cancer induction by use of the carcinogen 4NQO during 140 days; Group Tongue Cancer + Periodontal Disease, in which animals were submitted initially to 4NQO during 140 days and, after, ligature-induced periodontal disease during 14 days; Group Periodontal Disease + Tongue Cancer, which periodontal disease was induced during 14 days and, after, exposure to 4NQO during 140 days. Animals were killed after the end of the experiment and specimens were stored for evaluation. Leucocyte counts were performed in blood smears and IL-6 dosage performed by ELISA. To this analysis, 5 animals were randomly selected per group. The results were compared among groups by ANOVA or Kruskal-Wallis. All animals exposed to 4NQO developed neoplastic alterations in the tongue. With respect to leucocyte counts, a higher number of lymphocytes was observed in animals with periodontal disease. In relation to monocytes, animals submitted to ligature-induced periodontal disease presented lower amounts; on the other hand, neutrophils were found in higher numbers in animals exposed to 4NQO. IL-6 dosages did not statistically differ among groups. The combinations of exposure to 4NQO and periodontal inflammation do not affect IL-6 dosages and modulated the expression of serum leukocytes.

Keywords: Interleukin 6. Periodontal disease. Tongue cancer. Leukocytes

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>8</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>24</b>

## **1 APRESENTAÇÃO**

Estudos publicados recentemente têm sugerido uma possível associação ente doença periodontal e diversos tipos de câncer, incluindo câncer de língua. No entanto, até o momento poucos são os estudos que conseguiram sanar algumas das dúvidas e curiosidades sobre o assunto. O presente trabalho de conclusão de curso é parte de um projeto maior intitulado “Inter-relação entre doença periodontal e câncer lingual induzido por 4-nitroquinolina 1-óxido (4nqo) em ratos Wistar“. São apresentados os resultados das análises laboratoriais de contagens de leucócitos no sangue e dosagens de interleucina-6 (IL-6). O trabalho é apresentado sob a forma de artigo que, após análise pela comissão examinadora, será traduzido e formatado para o periódico Oral Oncology.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Análise de dosagens de Interleucina-6 (IL-6) e de leucócitos em ratos Wistar submetidos a indução de câncer de língua e doença periodontal.

### Introdução

A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que pode ser encontrada em tecidos e também em fluidos como sangue e saliva<sup>1</sup>. A produção de IL-6 é controlada pelo fator nuclear-κB (NF-κB) que é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa, e na inflamação. Assim, são descritos efeitos nas respostas de estresse celular, adesão celular, apoptose, e proliferação<sup>2</sup>. Níveis elevados de IL-6 foram encontrados em tecidos gengivais com doença periodontal após serem realizadas biopsias<sup>3</sup>. Ela é encontrada em outras doenças incluindo inflamações crônicas, doenças autoimunes e em carcinomas de cabeça e pescoço<sup>10</sup>. As concentrações de IL-6 na saliva de pacientes com carcinoma oral de células escamosas também apresentam níveis elevados.<sup>3-4</sup>

O câncer está entre as principais doenças crônicas do mundo, e que podem levar a óbito<sup>6</sup>. Entre todos os tipos, o câncer de boca é considerado como o sexto em nível de incidência e, entre os tipos de carcinoma oral, o epidermoide é encontrado em aproximadamente 90% dos casos de câncer de boca<sup>5</sup>. Até o presente momento são conhecidos vários fatores de risco para o desenvolvimento de câncer bucal, tais como: exposição ao fumo, consumo de álcool, infecções por vírus, fatores genéticos, fatores nutricionais e infecções bacterianas crônicas<sup>7</sup>. Álcool e fumo são fatores de risco bem estabelecidos e predominantes no desenvolvimento de câncer. Dentre as novas hipóteses que vêm sendo estudadas, a presença de infecções bucais que resultam em um processo inflamatório tem sido enfatizada, pois pode causar uma atividade proliferativa nos tecidos bucais, resultando em neoplasias, inclusive malignas. Entretanto, as evidências para essa relação com possível causalidade ainda não estão totalmente claras<sup>8</sup>.

As evidências na literatura que suportam a relação entre doença periodontal e câncer bucal são crescentes<sup>9-16</sup>. Segundo uma revisão de literatura associando o câncer bucal com a doença periodontal, as infecções bucais podem causar uma transformação maligna nos tecidos bucais<sup>8</sup>. O mecanismo proposto para o processo envolvendo as infecções localizadas e câncer ocorre pela sequência a seguir: (a) alteração fisiológica do hospedeiro, como a inflamação, causada pelas bactérias; (b) modificação da linfoproliferação de antígenos pela influência da infecção; (c) aumento da proliferação de células epiteliais causado pelo desequilíbrio hormonal; (d) efeito direto na transformação celular; (e) produção de metabólitos tóxicos e carcinogênicos pelas bactérias<sup>10</sup>.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as dosagens de IL-6 e leucócitos no sangue de ratos Wistar expostos a indução de doença periodontal e câncer de língua. A hipótese em estudo é que a exposição a carcinógeno e desenvolvimento de

neoplasia, assim como a presença de inflamação periodontal modulam a expressão de IL-6 e de leucócitos no sangue.

## **Materiais e Métodos**

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, controlado em modelo animal. O presente estudo segue as normas da Lei de Procedimentos para Uso Científico de Animais Lei nº 11.794 (08.10.2008) e também seguiu as normas da Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978), assim como das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais<sup>22</sup> (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS). sendo aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UFRGS (protocolo nº 22959).

Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 dias de vida e peso médio de 250g. Os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos: Grupo Controle (CT), o qual não sofreu indução de Doença Periodontal nem de Câncer de Língua; Grupo Doença Periodontal(DP), no qual os animais sofreram indução de Doença Periodontal através de ligadura por fio de sutura no segundo molar superior do lado direito por 140 dias; Grupo Câncer de Língua (CL), em que os animais sofreram indução de câncer através do carcinógeno 4 Nitroquinolina 1 Óxido (4NQO) diluído na água dos animais em uma concentração de 50ppm por 140 dias; Grupo Doença Periodontal + Câncer de Língua (DP+CL), submetido inicialmente por 14 dias somente a indução a DP e após indução de Câncer de Língua por meio de exposição ao 4NQO por 140 dias; Grupo Câncer de Língua + Doença Periodontal (CL+DP), em que os animais sofreram inicialmente indução de Câncer pelo carcinógeno 4NQO por 140 dias e após indução de Doença Periodontal por 14 dias.

A Figura 1 demonstra o fluxograma de desenvolvimento do Experimento.

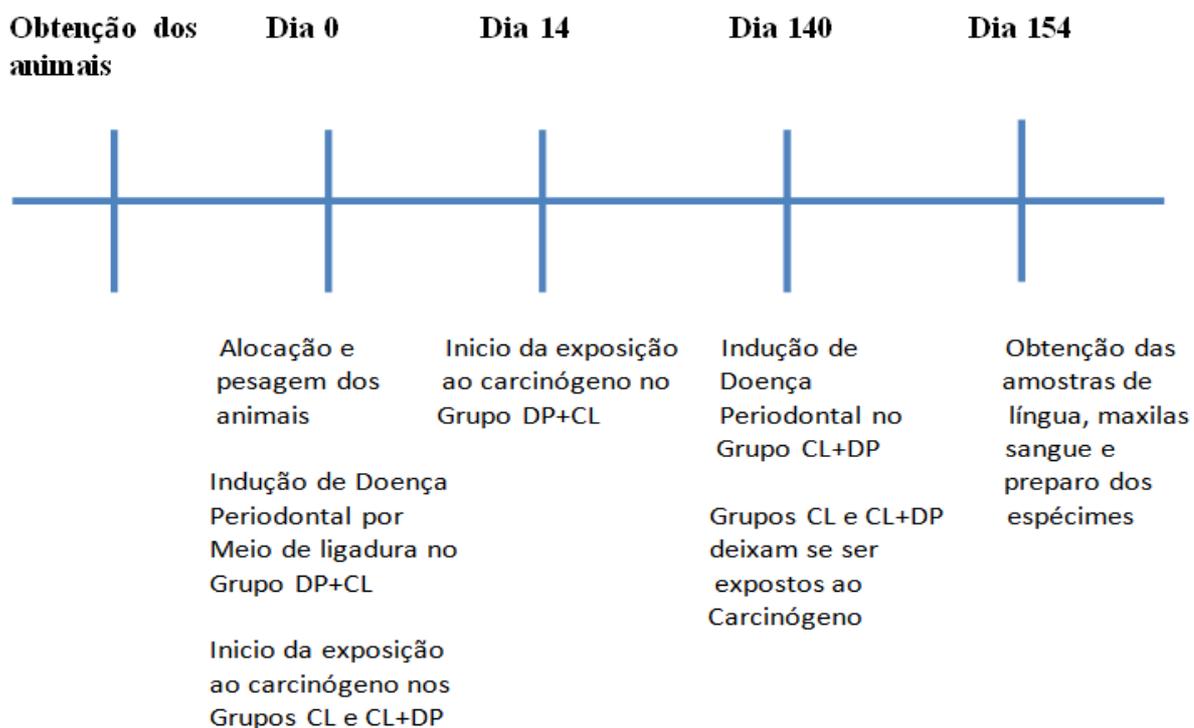


Figura 1- Desenho esquemático das diferentes fases do estudo

Grupo CT-(Controle) ausência de indução de Doença Periodontal e Câncer de língua; Grupo DP-(Doença Periodontal) Indução de Doença Periodontal e ausência de Indução de Câncer de Língua; Grupo CL-(Câncer de Língua) Indução de Câncer de Língua; Grupo CL+DP-(Câncer de Língua + Doença Periodontal) Indução de Câncer de Língua e Doença Periodontal; Grupo DP+CL-(Doença Periodontal + Câncer de Língua) Indução de Doença Periodontal e Câncer de Língua.

### Exposição ao carcinógeno

O carcinógeno 4 Nitroquinolina 1 Óxido (4NQO) foi administrado em água filtrada em uma concentração de 50ppm, através da diluição de 50mg do 4NQO em pó por litro de água<sup>11-12-13</sup>. As soluções foram administradas e armazenadas semanalmente em garrafas revestidas com isolamento para luz, devido à fotólise (segundo orientações do fabricante). Os grupos expostos ao carcinógeno receberam água concentrada a 50ppm de 4NQO, com reposição da solução carcinogênica três vezes por semana. Tendo em vista que o 4NQO é um carcinógeno e que pode causar riscos para seres humanos também, o mesmo foi manipulado segundo orientações do fabricante, sendo assim minimizados os riscos de contato<sup>17</sup>.

A indução de câncer pelo carcinógeno 4NQO ocorreu por um período de 20 semanas, tempo esse para que ocorressem lesões macroscópicas na língua dos animais<sup>13-21-23</sup>.

## **Indução de Doença Periodontal**

A Doença Periodontal foi induzida por meio de ligadura no segundo molar superior do lado direito. A colocação das ligaduras foi realizada sob anestesia geral, com a supervisão de um médico veterinário. Todos os animais que não receberam ligadura também foram anestesiados nos mesmos momentos para assim diminuir o viés de estresse. O anestésico utilizado foi Cloridrato de Cetamina 5% (80mg/kg) administrado conjuntamente a um fármaco relaxante - Xilazina 2% (0,8mg/kg). Ambos foram utilizados em uma proporção de 1:1 (mL). Uma concentração de 0,2 ml/100g de peso do animal dessa mistura foi administrada e aplicada por via intra-periodontal. Na sequência, foi realizada a colocação de ligaduras utilizando fio de seda 4-0, com o auxílio de porta agulhas Castro Viejo e pinças. O fio ficou retido na região cervical do segundo molar superior do lado direito, para que assim, pudesse ocorrer o acúmulo de placa bacteriana e ocorrência de Doença Periodontal. A colocação das ligaduras seguiu a metodologia publicada por Galvão et al.<sup>14</sup> e Sallay et al.<sup>24</sup> A presença das ligaduras nos animais foi verificada semanalmente e, em caso de perda, a mesma foi recolocada.

## **Morte dos Animais e Obtenção das Peças Maxilares**

Os animais foram mortos após 20 semanas do início do experimento, conforme demonstrado na Figura 1. A morte dos animais ocorreu por decapitação, 24 depois das últimas avaliações *in vivo* com um período de 12 horas de jejum. Esse método foi utilizado com o intuito de fazer uma coleta maior de sangue para análises do projeto. As maxilas foram removidas com uso de cinzéis, armazenadas em formalina tamponada 10%, sendo todos dos grupos devidamente separados e etiquetados conforme número do animal e grupo de identificação. A mucosa na região palatina foi removida com uso de lâminas de bisturi 15c e com o auxílio de descoladores micro freer, sendo as peças armazenadas. As maxilas foram imersas em hipoclorito de sódio 9% por 5 horas para remoção posterior de tecidos moles com uso de cinzéis. O sangue coletado foi armazenado em frascos tipo eppendorf de 1,5mL, para posterior análise das dosagens sorológicas de IL-6. Uma parte do sangue também foi colocada em lâminas de esfregaço sanguíneo.

## **Coleta de Sangue**

A coleta de sangue ocorreu no momento da decapitação dos animais, sendo o sangue armazenado em frascos tipo eppendorf com capacidade a 1,5mL de armazenamento. As amostras de sangue foram centrifugadas (4°C, 3.200 xg, 10 min) o soro foi conservado em nitrogênio líquido a -80°C até o momento da análise. A dosagem de IL-6 no soro foi realizada pelo método ELISA<sup>15</sup>. A análise do sangue ocorreu por alteração de absorvância de comprimento de onda 450nm, com correção para 560nm, sendo usado para isso um leitor de ELISA (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA).

## **Esfregaço Sanguíneo**

No momento da coleta de sangue, foram realizadas as lâminas de esfregaço sanguíneo, as quais foram secas e coradas com corante hematológico Panótico. A contagem dos leucócitos se deu por um examinador cego e calibrado, utilizando-se microscópio binocular Olympus Optical modelo CH30RF100, no aumento 400x. Foram observadas as 200 primeiras células inflamatórias de cada lâmina.

## **Análise dos Dados**

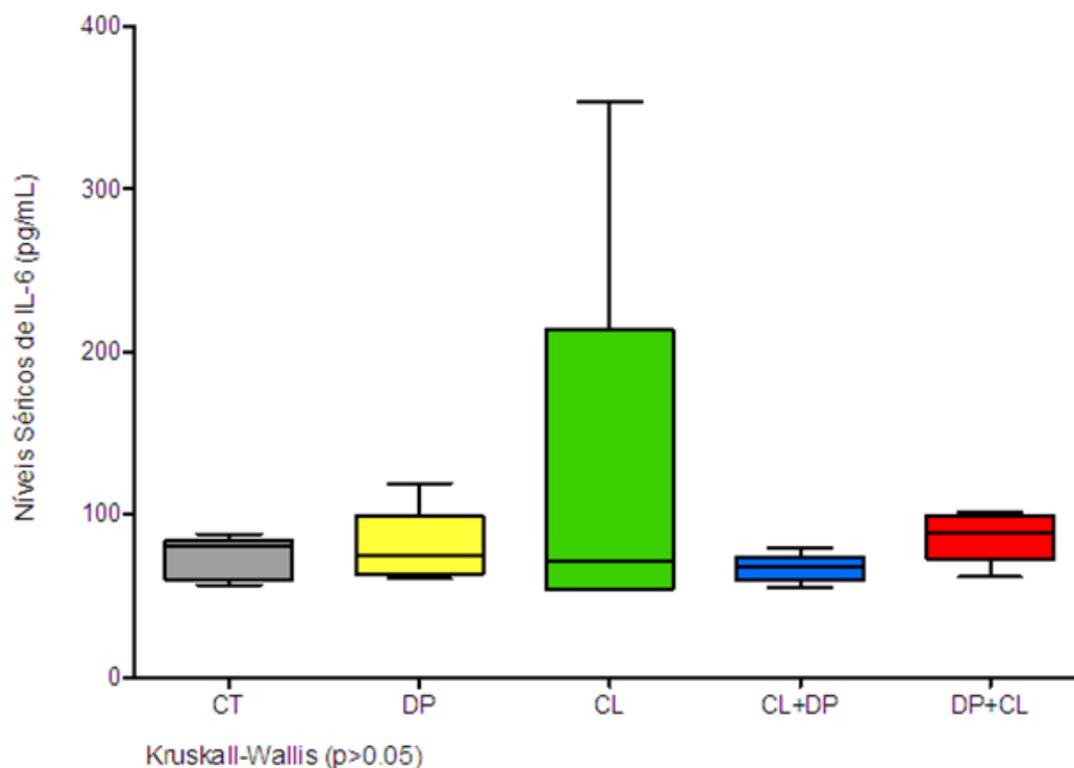
Todas as análises do presente estudo foram realizadas em 5 animais por grupo, randomicamente selecionados por sorteio do total de amostras disponíveis. A normalidade dos dados de cada um dos parâmetros avaliados foi testada por meio do teste de Shapiro Wilk. Foram geradas médias e desvio padrão para os dados com distribuição normal e mediana e intervalo interquartil para os dados assimétricos. Todos os dados de contagens de células apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de ANOVA seguida do teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Quando a normalidade foi testada para IL-6 não foi observada distribuição normal e a mesma foi analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis. Todos os dados foram avaliados em software estatístico (Stata, College Station, TX) e o nível de significância estabelecido foi de 0.05.

## **Resultados**

Todos os animais dos grupos expostos ao 4NQO desenvolveram lesões neoplásicas macroscopicamente detectáveis na língua. (dados incluídos em um trabalho adicional) Da mesma forma, os lados com ligadura dos animais submetidos a indução de destruição periodontal apresentaram-se significativamente com maiores graus de perda óssea alveolar (dados incluídos em um trabalho adicional).

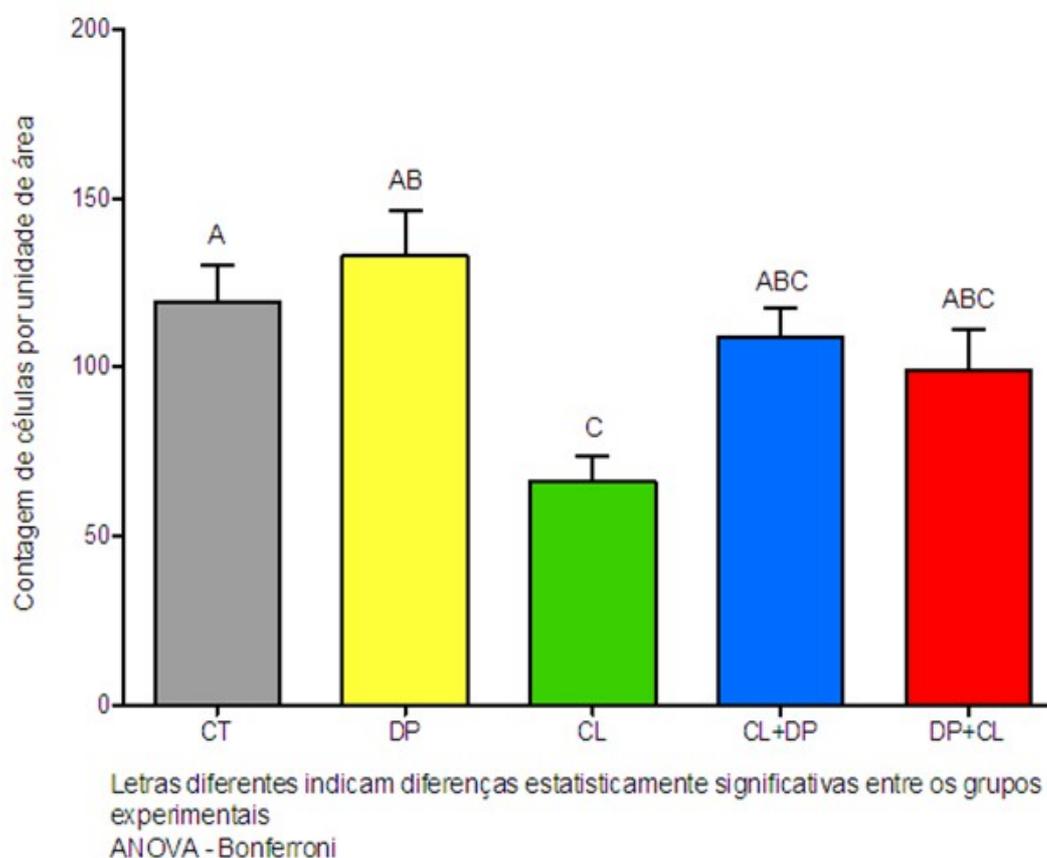
Os dados obtidos das análises do presente estudo estão demonstrados nas Figuras 2 a 5. A Figura 2 demonstra a dosagem de IL-6 no soro no final do período experimental. Foi verificada uma grande variabilidade nas contagens de IL-6 especialmente no grupo CL (Câncer de Língua somente), mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

Figura 2. Níveis séricos de IL-6 no soro dos animais de acordo com os grupos experimentais ao final do período experimental.



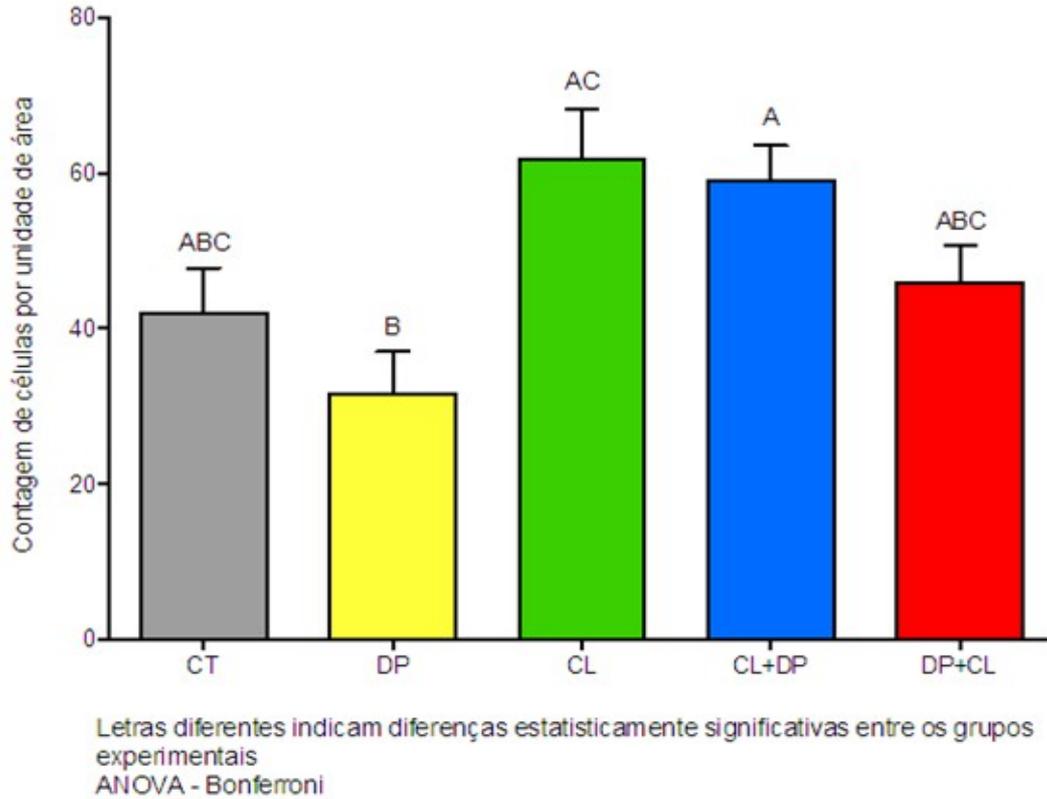
Os resultados referentes a contagem de linfócitos são demonstrados na Figura 3. Observa-se que o grupo CL (exposto somente ao carcinógeno) foi o que apresentou menores contagens de linfócitos quando comparado os demais grupos experimentais. No entanto diferenças estatisticamente significativas foram observadas somente quando comparado o grupo CL com os grupos CT e DP.

Figura 3. Contagem média de linfócitos por unidade de área de acordo com os Grupos experimentais.



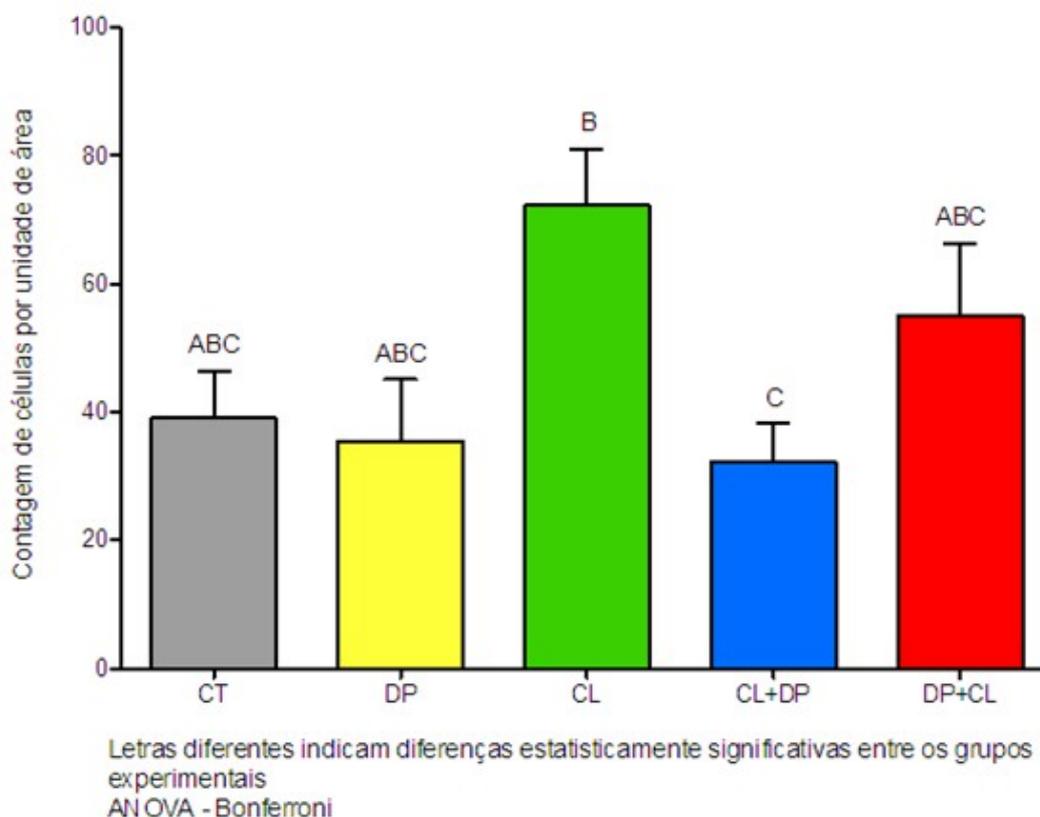
Na Figura 4, verifica-se a contagem de neutrófilos dos animais participantes do estudo. Observa-se que a exposição ao carcinógeno (grupos CL, CL+DP e DP+CL) gerou maiores contagens de polimorfonucleares neutrófilos. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre o grupo que recebeu a indução de doença periodontal (DP) e o grupo que recebeu indução de câncer lingual apenas (CL). Também observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo DP e aquele em que foi induzido primeiramente o câncer lingual seguido da doença periodontal (CL+DP).

Figura 4. Contagem média de neutrófilos por unidade de área de acordo com os grupos experimentais.



As contagens de monócitos são apresentadas na Figura 5. Verifica-se que a única diferença estatisticamente significativa foi verificada entre os grupos CL e CL+DP.

Figura 5. Contagem média de monócitos por unidade de área de acordo com os grupos experimentais.



## Discussão

O presente estudo objetivou analisar dosagens de IL-6 e de leucócitos de ratos oriundos de um estudo que analisou o efeito da exposição a um carcinógeno (4NQO) e a indução de doença periodontal em diferentes combinações. Tendo em vista condições logísticas e de recursos, amostras de 5 ratos por grupo foram utilizadas. A escolha dos animais a serem incluídos nesta análise se deu por sorteio. Essa abordagem baseia-se em estudos prévios que têm utilizado números semelhantes por animal e têm conseguido demonstrar consistentemente seus resultados em termos de parâmetros semelhantes<sup>25</sup>.

A interpretação dos achados desse experimento demanda um olhar para a literatura para que se possa analisá-los em perspectiva. Primeiramente, é importante ressaltar que tanto patogênese de doença periodontal como desenvolvimento experimental de lesões neoplásicas demandam modelos animais para que a construção do conhecimento. Ratos Wistar têm sido utilizados tanto em estudos versando sobre patogênese de doença periodontal quanto de câncer<sup>9,19</sup>. Esse modelo animal guarda semelhanças anatômicas e de metabolismo com seres humanos, o que infere potencial translacional. A utilização de animais tem forte justificativa em aspectos

éticos, uma vez que o desenvolvimento de neoplasias e de doenças destrutivas como as periodontais não pode ser realizado experimentalmente em humanos. Ambos os modelos utilizados têm sido amplamente utilizados na literatura. O 4NQO é um carcinógeno efetivo em gerar desenvolvimento de câncer de boca e em outras partes do organismo. Estudos demonstram que a exposição ao 4NQO em tempos similares ao do presente estudo é capaz de gerar lesões neoplásicas, incluindo a língua<sup>11,44</sup>. Os resultados clínicos de avaliação macroscópica confirmaram essa informação, uma vez que todos os animais expostos ao 4NQO desenvolveram alterações neoplásicas. No que se refere à indução de doença periodontal, estudos demonstram que a colocação de ligaduras com o objetivo de acumular biofilme é efetiva em promover destruição periodontal<sup>19,26</sup>. Os resultados de destruição periodontal medidos por morfometria também confirmam a efetividade do método, uma vez que os grupos experimentais expostos a ligadura, apresentaram médias de destruição periodontal com diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos não expostos. O presente estudo tomou como cuidado o tempo experimental. Assim, a exposição ao carcinógeno se deu por 140 dias, considerado suficiente para o desenvolvimento de neoplasia<sup>12</sup>. Da mesma forma, a exposição a ligaduras se deu por pelo menos 14 dias, também suficiente para o desenvolvimento de destruição periodontal<sup>20</sup>.

É importante destacar que para incrementar a validade interna do presente estudo, princípios contemporâneos de pesquisa foram utilizados. A distribuição dos grupos, assim como a seleção dos animais para a presente análise foram feitas a partir de estratégia de randomização (sorteio), minimizando vies de seleção. Nas análises clínicas, cegamento e reprodutibilidade dos resultados foram também utilizados, minimizando vieses de aferição. Também, para a presente análise, o cegamento do processo de análise de IL-6 e de leucócitos foi utilizado, uma vez que o operador desconhecia a distribuição amostral<sup>27</sup>. A concepção do presente estudo baseia-se nas evidências de associação entre doença periodontal e câncer<sup>8,16</sup>, assim como no possível papel da inflamação no desenvolvimento de neoplasias<sup>9</sup>. No presente estudo, utilizou-se a destruição periodontal como um indicador da presença de inflamação. Sabe-se que o processo inflamatório periodontal é capaz de gerar inflamação local e sistêmica<sup>28</sup>, tendo potencial de contribuir para o desenvolvimento de neoplasias. Os parâmetros utilizados no presente estudo (IL-6 e leucócitos sabidamente são alterados durante o desenvolvimento da doença periodontal<sup>29-30</sup>).

Nesse sentido, o presente estudo valeu-se de 5 grupos: o grupo controle objetivou ser a referência para comparação com os demais grupos, uma vez que não houve exposição a agentes morbígenos externos; o grupo DP foi utilizado para que os efeitos exclusivos da presença de inflamação periodontal fossem observados, permitindo comparações com os eventuais efeitos adicionais da exposição a carcinógeno; o grupo CL teve por meta avaliar as alterações oriundas exclusivamente da exposição ao carcinógeno; o grupo CL+DP intencionou verificar eventuais efeitos da presença de inflamação periodontal em animais que já apresentavam lesões neoplásicas na língua; o grupo DP + CL procurou determinar se a presença de inflamação periodontal modularia o desenvolvimento de câncer. Assim, a análise da IL-6 e dos leucócitos utilizada neste experimento tem por base as premissas clínicas da distribuição dos grupos. Nesse sentido, são utilizadas no presente estudo como forma de procurar compreender alguns mecanismos de plausibilidade biológica da associação entre doença periodontal e câncer.

Os resultados do presente estudo demonstraram aspectos interessantes que podem servir para a compreensão de importantes aspectos da relação entre doença periodontal e câncer. Primeiramente a IL-6 foi escolhida como uma citocina pró-inflamatória que também tem sido utilizada como um biomarcador em estudos de carcinogênese e em recidivas de câncer<sup>31-32</sup>. Assim, teria potencial de elucidar parte do processo carcinogênico na presença de doença periodontal. Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo não conseguiram demonstrar dosagens que apresentassem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Esse fato não sepulta a questão uma vez que sabidamente as análises de citocinas apresentam grande variabilidade em diferentes estudos<sup>10,33</sup>. Essa variabilidade foi maior no grupo exposto somente ao carcinógeno (CL). O incremento de número de animais poderia minimizar tal efeito, entretanto os cálculos apontam para necessidades de grupos extremamente amplos de animais, por exemplo com mais de 30 animais por grupo, o que está em desacordo com o princípio ético de redução de número de animais em estudos<sup>43</sup>. A análise dos leucócitos apresentou resultados desafiadores no que se refere a sua interpretação. Em relação a contagens de linfócitos, os grupos expostos ao carcinógeno apresentaram menores valores médios. Entretanto, a presença concomitante de inflamação periodontal aproxima estes resultados dos grupos não expostos ao 4NQO. Esse padrão poderia estar relacionado com o fato de que a doença periodontal configura-se como uma inflamação crônica, que tem nos linfócitos células importantes de defesa, presentes na fase crônica da inflamação<sup>34</sup>. Assim, a presença de doença periodontal potencialmente modifica o efeito da exposição isolada ao carcinógeno em termos de linfócitos. Isso é suportado pelo fato de que o sistema imunitário é importante para a eliminação de células cancerosas. Adicionalmente, tumores e também carcinoma de células escamosas na cavidade oral são capazes de escapar da detecção das células imunitárias do hospedeiro por depleção da apoptose de linfócitos infiltrantes de tumor. A diminuição de linfócitos circulantes em pacientes com tumores foi correlacionada com a diminuição de linfócitos infiltrantes de tumor, que foram associados com o aumento da detecção de apoptose no tecido tumoral<sup>35</sup>.

No que se refere a contagem de neutrófilos, o grupo exposto somente a indução de doença periodontal foi o que apresentou as menores contagens, inclusive que em relação ao grupo controle. Levanta-se como hipótese o fato de que o neutrófilo é o elemento celular vinculado a início de inflamação (aguda) e a inflamação periodontal tem perfil crônico. Além disso, sabe-se que o perfil de neutrófilos tem grande importância no desenvolvimento de doença periodontal destrutiva tendo em vista que, os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa em relação a doença periodontal, é natural que no decorrer da evolução da mesma, a qual tem caráter crônico, a contagem de neutrófilos seja menor.<sup>36</sup> No entanto, o motivo da maior contagem de neutrófilos no grupo controle ainda é desconhecido. É comum que se encontre níveis altos de leucócitos em pacientes portadores de algum tipo de câncer, tendo em vista que, a neutrofilia é relacionada com possível surgimento de neoplasia. Assim, a contagem alta de neutrófilos seria esperada nos grupos que sofreram indução ao carcinógeno 4NQO<sup>37</sup>.

Os monócitos apresentaram um padrão variável com diferença estatisticamente significativa encontrada entre os grupos CL e CL+DP. Supõe-se que a indução de doença periodontal em áreas já com neoplasias diminui o número de monócitos presentes. Em alguns casos de doença periodontal já foi observada a diminuição dos níveis de fagocitose que ocorrem por monócitos, ainda não se tem uma resposta para isso<sup>38</sup>. No entanto, surgem algumas hipóteses, e é sabido que

muitos patógenos periodontais desenvolvem estratégias específicas para subverter os mecanismos de fagocitose<sup>39</sup>. Outra possível hipótese seria de que, por exemplo, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que é uma bactéria encontrada na doença periodontal, poderia modular a resposta de monócitos através de sua toxicidade<sup>40</sup>. A mesma também tem mecanismos capazes de controlar a fagocitose, tal como a inibição de quimiotaxia e imunossupressora de fatores citotóxicos que inibem tanto a resposta imune inespecífica como a resposta imune específica, bem como a proliferação de fibroblastos<sup>41</sup>. Carcinomas de boca promovem a ativação de fatores de transcrição e assim ocorrendo a secreção espontânea de quimiocinas e citocinas. Dentro dessas citocinas a IL-8 parece ativar a liberação angiogênica de monócitos dentro do micro ambiente tumoral através da via de ativação mitogênico proteína quinase<sup>42</sup>.

Os achados do presente estudo permitem concluir que as combinações de exposições a carcinógeno e inflamação periodontal não afetam dosagens de IL-6 e modulam a expressão de leucócitos sanguíneos, podendo, pelo menos em parte, explicar aspectos etiopatogênicos comuns ou sinérgicos nessa interação. A continuidade de estudos na temática é mandatória.

## REFERÊNCIAS

1- PETERSEN, P. E.; BAEHNI, P. C. Periodontal health and global public health. **Periodontol** **2000**, v. 60, n. 1, p. 7-14, Oct, 2012.

2-Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clin Exp Immunol* 2007; 148:307-324.

3-St John MA, Li Y, Zhou X, et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:929-935.

4-Arellano-Garcia ME, Hu S, Wang J, et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral Dis* 2008;14:705-712.

5-SILVERMAN, S., JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J Am Dent Assoc**, v. 132 Suppl, p. 7S-11S, Nov, 2001.

6- Yi-Shing Lisa Cheng, Lee Jordan,\*Lakshmi Mitreyi Gorugantula, Emet Schneiderman,Huey-Shys Chen, and Terry Reesi. Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. *J Periodontol*.2014 July;85(7):956

7- SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 3, p. e306-11, May, 2011.

8- MEURMAN, J.; BASCONES-MARTINEZ, A. Are oral and dental diseases linked to cancer? **Oral Dis**, Jul 4, 2011.

9- FITZPATRICK, S. G.; KATZ, J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. **J Dent**, v. 38, n. 2, p. 83-95, Feb, 2010.

10- ALIZERA.L.et al. **Serum Level of Interleukin-6 in Patients with Oral Tongue Squamous cell Carcinoma**; Iranian Journal of Otorhinolaryngology, Vol.27 (3), Serial No.80, May 2015.

11- RIVERA, M.C.A. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. Morphol.**, v. 30, n. 1, p. 309-314, 2012.

12- RIVERA et al. Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. **J Dent Res**, v. 90, n. 6, p. 799-803, Jun, 2011.

13- RIBEIRO, D. A. et al. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 40, n. 9, p. 910-5, Oct, 2004.

14- GALVAO, M. P. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, n. 1, p. 56-62, Jan-Mar, 2003.

15- **ÓRPEZ-ZAFRA, T.** et al. Development and validation of an **ELISA** for quantification of soluble IFN- $\beta$  receptor: assessment in multiple sclerosis. **Bioanalysis**. 2015 Nov 16.

16- TEZAL, M.; GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Is periodontitis associated with oral neoplasms? **J Periodontol**, v. 76, n. 3, p. 406-10, Mar, 2005.

17- 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.

18- PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J Periodontol**, v. 76, n. 12, p. 2187-93, Dec, 2005.

- 19- GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol**, v. 15, p. 117-32, 2012.
- 20- GRAVES, D. T. et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 2, p. 89-105, Feb, 2008.
- 21- VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J Oncol**, v. 32, n. 4, p. 729-37, Apr, 2008.
- 22- GOLDIM, R. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2. Porto Alegre: 1997.
- 23- KANOJIA, D., VAIDYA, M. M. **4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis**. *Oral Oncol*. v.42, n.7, p.655-67, 2006.
- 24- SALLAY, K., et al. **Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat**. *J. Periodontal Res*. v.17, n.3, p.263-74, 1982.
- 25- **KIM.T.W. et al. Oral mucosal carcinogenesis in senear mice. Anticancer Res**. 2002 Sep-Oct;22(5):2733-40.
- 26- BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, v. 71, n. 6, p. 1009-14, Jun, 2000.
- 27- SUSIN. C ,ROSING.C.K – **Praticando Odontologia Baseada em Evidências**, v.2, n.1, p.35-42. 1999.
- 28- GULATI, M. et al. **Essentials of Periodontal Medicine in Preventive Medicine**. *Int J Prev Med*, v. 4, n. 9, p. 988-994, Sep, 2013.
- 29- EBERSOLE.J.L. et al. **Cytokine Gene Expression Profiles during Initiation, Progression and Resolution of Periodontitis**. *J Clin Periodontol*. 2014 September ; 41(9): 853–861. doi:10.1111/jcpe.12286.
- 30- **KEYES P.H, RAMS T.E. Subgingival Microbial and Inflammatory Cell Morphotypes Associated with Chronic Periodontitis Progression in Treated Adults**. *J Int Acad Periodontol*. 2015 Apr;17(2):49-57.
- 31- TAWARA.K. et al. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. *Cancer Management and Research* 2011;3 177–189.

32- JINNO.T. et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *ONCOLOGY REPORTS* 33: 2161-2168, 2015

33- SCHUMACHER.N. et al. **Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles.** *J Biol Chem.* 2015 Oct 23;290(43):26059-71. doi: 10.1074/jbc.M115.649509. Epub 2015 Sep 10.

34- MELGAR-RODRIGUEZ. S. et al. **Serotype b of Aggregatibacter actinomycetemcomitans increases osteoclast and memory T lymphocyte activation.** *Mol Oral Microbiol.* 2015 Jul 14. doi: 10.1111/omi.12112

35- GRIMM M, FEYEN O. et al. **Immunophenotyping of patients with oral squamous cell carcinoma in peripheral blood and associated tumor tissue.** *Tumour Biol.* 2015 Oct 16.

36- MUMCU.G, CIMILLI.H, KARACAYLI. Ü. et al. **Salivary levels of HNP 1-3 are related to oral ulcer activity in Behçet's disease.** *Int J Dermatol.* 2013 Oct;52(10):1198-201.

37- FERNANDES JUNIOR, P. C. et al. **Avaliação de Neutrófilos Circulantes em Pacientes com Neoplasia Pré-invasiva e Invasiva de Colo Uterino.** Tese de Mestrado em Patologia Ginecológica e Obstétrica –Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, 2011.

38- CARNEIRO.V.M.A. et al. Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* July 08, 2011

39- UNDERHILL.D.M, OZINSKY.A. **Phagocytosis of microbes: complexity in action.** *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52.

40- KURITA-OCHIAI.T, IKEDA.T. Immunosuppressive effect induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: effect on immunoglobulin production and lymphokine synthesis. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7:338-43.

41- TSAI.C.C, McARTHUR.W.P, BAEHNI.P.C, HAMMOND.B.F, TAICHMAN.N.S. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* 1979;25:427-39.

- 42- **NISHIO.Y. et al. Cancer cell-derived IL-8 induces monocytic THP1 cells to secrete IL-8 via the mitogen-activated protein kinase pathway. Tumour Biol. 2015 Jun 19.**
- 43- **KIKKENNY.C. et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.June 29, 2010**
- 44- **FERNANDES, M. I. et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. Braz Oral Res, v. 21, n. 3, p. 216- 21, Jul-Sep, 2007.**

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo foi realizado em ratos Wistar, procurando contribuir com o conhecimento etiopatogênico da relação entre doença periodontal e câncer bucal. Trata-se de um estudo que tem potencial de gerar hipóteses a respeito do papel da IL-6 e de células inflamatórias nesse contexto.

Assim, observou-se que há modulação da expressão da IL-6 e das células inflamatórias com as diferentes interações experimentais entre câncer de língua e doença periodontal. Nesse sentido, uma lacuna na literatura permanece, com espaço para novos experimentos procurando elucidar eventuais papéis sinérgicos entre a patogênese das duas doenças. No momento, parece que o perfil inflamatório pode ser um suscitador de uma resposta neoplásica mais exacerbada.