

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM PATOLOGIA BUCAL**

ISADORA FOLLAK DE SOUZA

**EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA MODULAÇÃO DA PROTEÍNA
REGULADA POR GLICOSE 78 (GRP78) DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL**

Porto Alegre, 2019

ISADORA FOLLAKE DE SOUZA

**EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA MODULAÇÃO DA PROTEÍNA
REGULADA POR GLICOSE 78 (GRP78) DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL**

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito a obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área De Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Follak de Souza, Isadora
EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA MODULAÇÃO DA
PROTEÍNA REGULADA POR GLICOSE 78 (GRP78) DURANTE A
CARCINOGENESE BUCAL / Isadora Follak de Souza. --
2019.
63 f.
Orientadora: Fernanda Visioli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2019.

1. Câncer bucal. 2. Carcinogênese bucal. 3.
Quimoprevenção. 4. GRP78. 5. Ácido Docosahexaenóico.
I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

ISADORA FOLLAKE DE SOUZA

**EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA MODULAÇÃO DA PROTEÍNA
REGULADA POR GLICOSE 78 (GRP78) DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito a obtenção do título de doutor em Odontologia.

Porto Alegre, 13 de dezembro de 2019

Vinícius Coelho Carrard
Doutor em Patologia Bucal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laura Campos Hildebrand
Doutora em Patologia Bucal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fábio Luiz dal Moro Maito
Doutor em Biologia Celular e Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é uma tarefa fácil, não pelo sentimento, pois a gratidão é imensa, mas por palavras não serem suficientes para demonstrar. Todos que passaram, e todos os momentos, foram fundamentais para chegar até aqui. Meu agradecimento inicial é ao meu Deus, que sempre me deu forças, apoio e soube das minhas maiores dificuldades e anseios.

À minha família, meu muito obrigada! Agradeço por sempre comemorarem as minhas conquistas e entenderem as minhas escolhas, assim como minha ausência em muitos momentos.

Como já falado, meu agradecimento se estende a todos que compartilharam de alguma maneira a minha jornada, colegas e professores da faculdade, especialização, colegas do mestrado, amigos que fiz em Niterói e que mesmo com alguma distância hoje, sei que estão junto.

Além de amigos, em Niterói, encontrei meu parceiro da vida. Ele, que desde que entrou na minha vida, esteve do meu lado. Nossa distância é apenas física, pois estamos sempre um com o outro, torcendo, apoiando, comemorando nossas conquistas. Diogo, você sabe que é meu porto seguro, e nunca canso de te agradecer por sermos nós, te amo.

No processo de terminar o Mestrado e entrar no Doutorado, me inscrevi no processo seletivo da UFRGS, minha orientadora viria a ser a professora Fernanda Visioli, assim que entrei, sempre ouvia dos colegas “Nossa, tu tens muita sorte de ser orientada dela”, e sim, tive mesmo! Com o passar do tempo a professora Fernanda virou “Fe”, e a admiração só crescendo. Não tenho palavras para agradecer por você ter me escolhido, lá na seleção, por você sempre estar disponível, pela tua paciência, pela tua compreensão, apoio e puxões de orelha. Sem dúvida tu és, além de profissional, uma mulher admirável, que inspira todos ao teu redor! Muito obrigada por tudo, mesmo!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao programa de Pós Graduação em Odontologia, agradeço a estrutura e

incentivo, e a todos os funcionários que fazem com que as coisas aconteçam. Aos professores, principalmente os da Patologia, Márcia, Laura, Vinicius, Pantelis, Manô, por todos os ensinamentos, paciência, apoio, rotinas, aulas, histórias, risadas, enfim... Obrigada!

Aos colegas da jornada Patológica, que me receberam tão bem na sala 503, companheiros de tantas rotinas, diagnósticos, disciplinas... Impossível nomear todos aqui, Nati's, Vivi's, Bi, Jú... Aos "visiológicos", que se não fossem eles, não teríamos esse trabalho hoje, Eduardo, Taiane, Arthur, Ian, Ewelyn, fomos "pais" de quase 90 ratos, minha gratidão pela amizade e disponibilidade de vocês!

Aos que foram entrando depois, não só na pato, como na convivência, Paloma, Belkiss, João, Bibi, Felipe, Obrigada! Minha gratidão é imensa a todos que fizeram parte da minha jornada, como já mencionado, seria impossível citar todos os nomes aqui, por isso gostaria de deixar um forte abraço, juntamente com o meu obrigada a todos!

RESUMO

O câncer bucal se caracteriza por um crescimento desordenado e descontrolado de células, é uma doença multifatorial, tendo como principais fatores de risco o fumo e o consumo de álcool. A super-expressão da proteína GRP78 (reguladora da ativação da UPR) já foi detectada em vários tipos de câncer. A utilização de substâncias para a quimioprevenção é uma estratégia de baixo risco para inibir o processo de carcinogênese. O ácido Docosahexaenóico (DHA), surgiu como opção potencialmente preventiva pela sua atividade pró-apoptótica, em parte por regular a expressão de GRP78 durante a carcinogênese. O objetivo foi avaliar o efeito preventivo do DHA na carcinogênese bucal em ratos Wistar, que foram divididos em 3 grupos: Grupo 1 (controle), Grupo 2 (4NQO+EtOH), Grupo 3 (4NQO+EtOH+DHA). Lesões clinicamente visíveis foram detectadas a partir de 15 semanas. Em 24 semanas, 100% e 91,66% dos animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, respectivamente apresentavam displasia epitelial, sendo a maioria de alto grau no grupo 4NQO+EtOH. A expressão de GRP78 aumentou ao longo do processo de carcinogênese, enquanto no grupo controle os níveis mantiveram-se estáveis. A atividade proliferativa, nos grupos 2 e 3, foi maior, principalmente na camada basal. Assim, concluímos que durante a carcinogênese bucal ocorre um aumento progressivo dos níveis de GRP78 e que a suplementação com DHA diminui seus níveis por um período limitado do processo, o que pode favorecer o desaceleramento da carcinogênese, mas não sua inibição.

Palavras-chave: Câncer bucal. carcinogênese bucal. unfolded protein response. UPR. GRP7. ácido Docosahexaenóico. modelo animal. quimioprevenção.

ABSTRACT

Oral cancer is characterized by uncontrolled and uncontrolled cell growth. It is a multifactorial disease, whose main risk factors are smoking and alcohol consumption. Overexpression of GRP78 (UPR activation regulator) protein has already been detected in several cancers. The use of chemoprevention substances is a low risk strategy to inhibit the carcinogenesis process. Docosahexaenoic acid (DHA) has emerged as a potentially preventive option for its pro-apoptotic activity, in part by regulating GRP78 expression during carcinogenesis. The objective was to evaluate the preventive effect of DHA on oral carcinogenesis in Wistar rats, which were divided into 3 groups: Group 1 (control), Group 2 (4NQO + EtOH), Group 3 (4NQO + EtOH + DHA). Clinically visible lesions were detected from 15 weeks. At 24 weeks, 100% and 91.66% of the animals in the 4NQO + EtOH and 4NQO + EtOH + DHA groups, respectively, had epithelial dysplasia, most of them being high grade in the 4NQO + EtOH group. GRP78 expression increased throughout the carcinogenesis process, while in the control group the levels remained stable. The proliferative activity in groups 2 and 3 was higher, especially in the basal layer. Thus, we conclude that during oral carcinogenesis there is a progressive increase in GRP78 levels and that supplementation with DHA decreases its levels for a limited period of the process, which may favor the deceleration of carcinogenesis, but not its inhibition.

Keywords: oral cancer; oral carcinogenesis; unfolded protein response; GRP78; Docosahexaenoic acid; animal model, chemoprevention.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES	10
1.1	CÂNCER BUCAL	10
1.2	RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO E A UPR	11
1.3	A UPR E A CARCINOGENESE.....	13
1.4	DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS	15
1.5	MODELOS DE CARCINOGENESE	16
1.6	QUIMIOPREVENÇÃO	17
1.7	QUIMIOPREVENÇÃO DA CARCINOGENESE BUCAL.....	18
1.8	ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)	19
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	GERAL.....	24
3.2	ESPECÍFICOS.....	24
4	ARTIGO	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 ANTECEDENTES

1.1 CÂNCER BUCAL

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 (INCA, 2016). O MINISTÉRIO DA SAÚDE, em 2015 estimou para 2016 o registro de 596.070 novos casos de câncer no Brasil. Destes, 15.490 seriam na cavidade bucal.

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).

A etiologia do câncer de boca é multifatorial, mas 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 apenas 50% aproximadamente (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 sobrevivência 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).

A carcinogênese inicia 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. 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).

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, 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, em inglês, Unfolded Protein Response (UPR) estão envolvidos no surgimento e progressão do câncer de cabeça e pescoço (LIN et al., 2010; SLOTTA-HUSPENINA et al., 2012).

1.2 RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO E A UPR

O estudo do envolvimento do RE 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 que resultam no aumento da síntese de proteínas mal dobradas, 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 (KAUFMAN, 2002). A agregação de proteínas é tóxica para a célula e muitas condições patológicas são associadas ao estresse do RE, como doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer (SZEGEZDI et al., 2006).

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

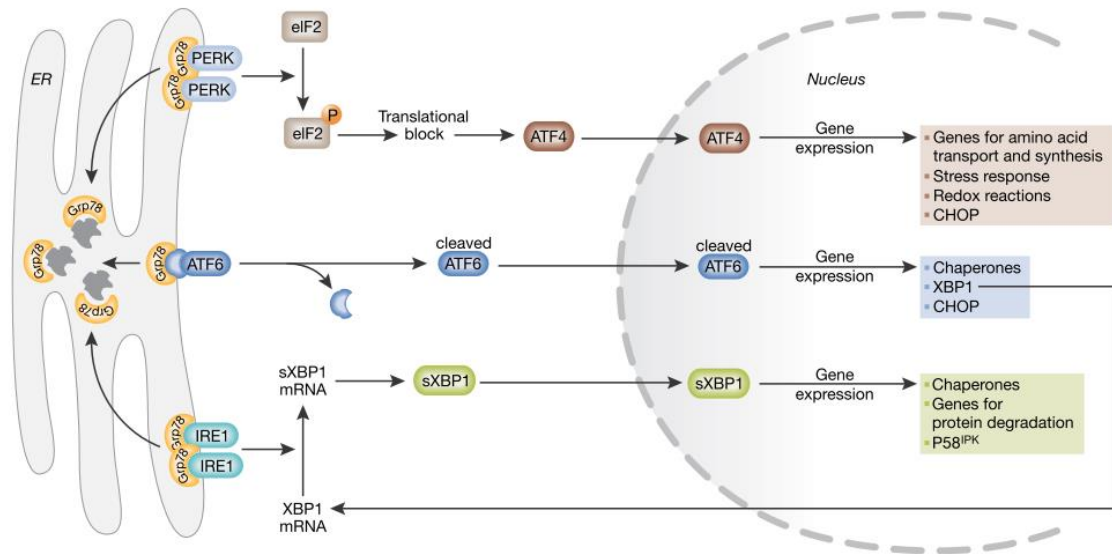
chaperonas encaminharão estas proteínas mal dobradas à destruição (FENTON; HORWICH, 2003).

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 ER, 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 eles. Porém a função da GRP78 não é realizar o enovelamento das proteínas, mas mantê-las no RE num estado favorável ao enovelamento (LEE, 2005).

Na tentativa de restabelecer a homeostasia do RE, a via UPR é ativada, a qual é regulada por três proteínas transmembranas, a IRE1 α (enzima dependente de inositol-1), ATF6 (fator de ativação transcricional 6) e PERK (quinase do retículo endoplasmático PKR-like), 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 se encontra 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 (SZEGEZDI et al., 2006)



O mecanismo de atuação busca 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. Entretanto este processo de adaptação da célula ainda não é bem compreendido (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2007).

1.3 A UPR E A CARCINOGENÊSE

Quando o câncer já está estabelecido, as células apresentam uma atividade altamente proliferativa mesmo com pouca vascularização, criando um microambiente desfavorável caracterizado por baixo pH, pouco 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).

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).

A UPR 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 (NAGELKERKE et al., 2013; HAZARI et al., 2016).

A sobre-expressão de GRP78 foi verificada em vários tipos de câncer, e um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico foram observados no câncer da próstata que sobre-expressam esta proteína. A presença desta proteína é um marcador da via UPR nas células (DICKS et al., 2015).

A PERK também tem papel importante na carcinogênese, ela fornece tanto sinais pró-sobrevivência e de sinalização pró-apoptótica. Ainda não está claro o que dita essa diferença de sinalização. Sabe-se que a PERK tem função na iniciação do tumor, na adaptação ao estresse do microambiente tumoral, e na quimio-resistência (BU; DIEHL, 2016).

Além de a UPR ter papel na carcinogênese, ela também atua na quimio-resistência dos tumores. Pela capacidade anti-apoptótica que a UPR fornece às células, estas acabam se tornando cada vez mais resistentes aos danos ao DNA. Essa capacidade das células se adaptarem ao microambiente tumoral, ao estresse causado pela hipóxia, autofagia e apoptose tornam os tumores mais agressivos e mais resistentes aos tratamentos anti-tumorais (DONG et al., 2005; LUO; LEE, 2013; CHEVET; HETZ; SAMALI, 2015; BU; DIEHL, 2016). Estudos que avaliaram a presença da proteína por meio da imuno-histoquímica sugerem que maior expressão do GRP78 desempenha um papel crucial na proliferação, migração e invasão de

células cancerígenas do pâncreas e é considerado marcador prognóstico adequado no adenocarcinoma ductal pancreático (NIU et al., 2015).

1.4 DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS

O reconhecimento das alterações clínicas e histopatológicas anteriores ao carcinoma espinocelular bucal é crucial para o diagnóstico e tratamento precoce dos pacientes.

O termo “Desordens potencialmente malignas” (DPM) é usado pois indica que nem todas as lesões e condições descritas sob esse termo podem se transformar em câncer, e sim que há alterações morfológicas entre as quais algumas podem ter um potencial aumentado para transformação maligna. Diversas lesões já foram incluídas nesse grupo como a leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e líquen plano (VAN DER WAAL, 2009).

A leucoplasia bucal é um termo usado para definir “placas predominantemente brancas de risco questionável, excluindo (outras) doenças ou distúrbios conhecidos que não apresentam risco aumentado de câncer” (VAN DER WAAL, 2009; WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). Em 2003, a prevalência mundial estimada para as leucoplasias estava entre 1,7% e 2,7% (PETTI, 2003). A taxa de transformação maligna das leucoplasias varia de 0,13% a 34,0% (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016), essa variação se dá pela ponderação pelos anos de acompanhamento das lesões, que varia em torno de 1% ao ano (VAN DER WAAL, 2009).

Microscopicamente, as leucoplasias podem apresentar diferentes distúrbios de proliferação e diferenciação epiteliais. Displasia epitelial é um termo usado para descrever distúrbios na arquitetura epitelial, acompanhados de atipia celular e perda de estratificação e maturação dos queratinócitos. A detecção de displasia é um dos principais preditores de transformação maligna nos tecidos (MUSTAFA et al., 2019). Encontrar formas de estacionar o processo que induz ao surgimento das DPM, ou a sua transformação, é um desafio, por isso diversas pesquisas buscam mecanismos que atuem desta forma.

1.5 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).

Os modelos químicos atualmente são os mais utilizados 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 (OSEI-SARFO et al., 2013).

O 4NQO 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, ao carcinoma *in situ*, 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 e é considerado um composto genotóxico, atuando 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, deficiências nutricionais e imunológicas (PÖSCHL; SEITZ, 2004; BOFFETTA; HASHIBE, 2006).

O uso do 4NQO e do etanol associados no modelo murino de carcinogênese se mostra útil 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).

1.6 QUIMIOPREVENÇÃO

O termo quimioprevenção refere-se ao uso de agentes e/ou substâncias para prevenir, interromper ou reverter o processo de transformação maligna das células (MONTEIRO DE OLIVEIRA NOVAES; WILLIAM, 2016). A quimioprevenção pode ser dividida em três estratégias principais: a primária, a secundária e a terciária. A quimioprevenção primária é usada para indivíduos saudáveis com risco elevado de desenvolvimento de câncer, por exemplo, indivíduos expostos à ação de carcinógenos, no presente ou no passado. Tipos de quimioprevenção primária incluem a vacinação contra o HPV e a interrupção do tabagismo. A quimioprevenção secundária tem a tarefa de inibir o progresso de carcinogênese já existente. A quimioprevenção terciária refere-se à prevenção de segundos tumores primários, bem como à recidiva em pacientes que tiveram sucesso no tratamento de carcinoma espinocelular prévias (WATTENBERG, 1985).

A identificação de possíveis agentes quimiopreventivos para realização de pesquisas vem de diferentes fontes, mas principalmente: (a) observações de populações que apresentam algum hábito alimentar específico e que apresentam uma menor incidência de algum câncer específico; (b) estudos epidemiológicos ou testes clínicos de alguns medicamentos que mostrem um número reduzido de cânceres em algumas populações de estudo como efeito secundário e (c) estudos de laboratório, com células e/ou animais, quando os exames mostram que o uso de algumas moléculas não apenas inibe a proliferação celular mas apresenta resultados como a reversão da malignidade (PATTERSON; COLBERT MARESSO; HAWK, 2013).

Um exemplo de sucesso na quimioprevenção do câncer é a utilização de Aspirina, uma droga anti-inflamatória e antiagregante plaquetária. Diversos estudos vem sendo desenvolvidos para correlacionar seu uso com a diminuição dos índices de surgimento e progressão de diversos tipos de câncer (CHUBAK et al., 2016; LIN et al., 2018, 2018; ROTHWELL et al., 2011; YE et al., 2013). Ensaios clínicos randomizados vem sendo desenvolvidos comparando o uso ou não da aspirina, e grandes amostras populacionais já foram observadas, mostrando os benefícios da ingestão da aspirina para redução das taxas de desenvolvimento do câncer, principalmente os de origem gastrointestinal (CAO et al., 2016; LIN et al., 2018; ROTHWELL et al., 2011).

1.7 QUIMIOPREVENÇÃO DA CARCINOGENESE BUCAL

A quimioprevenção, usada de forma tópica, é uma estratégia de baixo risco para inibir o processo de carcinogênese ou impedir a recorrência à malignidade. Como parte das lesões de câncer bucal progridem a partir de desordens potencialmente malignas que são clinicamente detectáveis, elas são ideais para intervenções precoces não invasivas. Assim, a tentativa de realizar a quimioprevenção direcionadas as lesões pode representar uma alternativa de gerenciamento para pacientes com estas condições (CHAU et al., 2017).

Os estudos sobre a quimioprevenção na cavidade bucal ganharam força no início dos anos 80, com os ensaios clínicos randomizados utilizando os retinóides, como a isotretinoína e o beta-caroteno (ARMSTRONG et al., 2013; HONG et al., 1986, 1990; LIPPMAN et al., 1993; PAPADIMITRAKOPOULOU et al., 2008; WILLIAM et al., 2016).

Encontramos na literatura diversas substâncias que vem sendo testadas em ensaios clínicos randomizados com a função de realizar a quimioprevenção das lesões bucais, alguns exemplos são a isotretinoína (ácido 13-cis retinóico) (PAPADIMITRAKOPOULOU et al., 2009), o beta-caroteno (NAGAO et al., 2015), os inibidores de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (PAPADIMITRAKOPOULOU et al., 2008), inibidores de bowman-brick (ARMSTRONG et al., 2013), erlotinibe (WILLIAM et al., 2016), extrato de chá verde (TSAO et al., 2009), e as framboesas pretas liofilizada (BRB) (MALLERY et al., 2014). Estes artigos foram incluídos em uma revisão

sistemática com meta análise que não sugeriu diferenças estatisticamente significativas na comparação da eficácia de agentes quimiopreventivos atuais com placebos (XIE; LIU, 2017).

Com o passar dos anos os ensaios clínicos randomizados vem se tornando mais específicos e com isso, estamos entrando em uma era de estudos de quimioprevenção, focando nos grupos de alto risco, nos quais o desfecho final pode ser avaliado de forma clinicamente significativa, como o desenvolvimento ou não do câncer bucal propriamente dita (MONTEIRO DE OLIVEIRA NOVAES; WILLIAM, 2016).

Outras substâncias que já possuem resultados positivos em outros tipo de câncer, podem também ser testados no processo de carcinogênese bucal, um exemplo é o ácido Docosahexaenóico (DHA) (FABIAN et al., 2015; GUCALP et al., 2018).

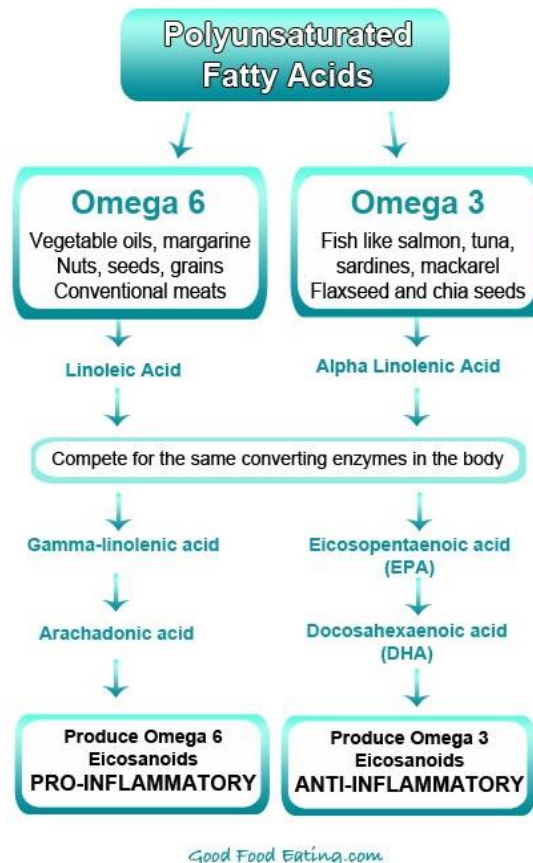
1.8 ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA)

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

A designação 3 na estrutura (Omega-3) refere-se à dupla ligação ao terceiro carbono no grupo metila (CALDER, 2011). Omega-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). Omega-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).

Figura 2 – PUFAs e seus compostos.



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 desenvolvimento de câncer de cólon (FASANO et al., 2012) e próstata em modelos animais (ZHANG et al., 2016) e *in vitro* (LI et al., 2014).

Entre os mecanismos já demonstrados que explicam a redução do risco de câncer de mama pela suplementação alimentar com DHA e EPA podemos citar: redução de fatores pró-inflamatórios eicosanoides 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 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. Os mecanismos de ação desta substância incluem atividade de componentes da superfície celular, como a membrana plasmática, 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 (WASSALL; STILLWELL, 2008; FASANO 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). Já há relatos que o GRP78 pode proteger as células da apoptose induzida pelo estresse do RE através da associação física e bloqueio da ativação da caspase-7, uma relação da inibição de GRP78 induzida pelo DHA e a ativação da caspase-7 podem ser sugeridas (REDDY et al., 2003). JAKOBSEN et al., em 2008 mostraram 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).

Outra função que o DHA tem mostrado é o potencial de aumentar a eficácia de agentes quimioterápicos, fazendo com que menores doses destas drogas sejam

administradas (GRANCI et al., 2013; RANI; VAIPHEI; AGNIHOTRI, 2014). Estudos em linhagens celulares de câncer e animais mostraram uma atividade coadjuvante potente com a suplementação de DHA. GAO et al. em 2016, demonstraram que a combinação de 5-FU com DHA em células de carcinoma de estômago atuaram sinergicamente através da parada do ciclo celular na fase G0/G1, além de causarem interferência no metabolismo energético das células.

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 mais bem investigada.

2 JUSTIFICATIVA

O processo de carcinogênese bucal é complexo e os mecanismos que levam à transformação cancerosa das células não são bem compreendidos.

A importância da UPR, expressa por meio do GRP78, para a sobrevivência das células tumorais já está bem estabelecida, no entanto seu papel durante a carcinogênese deve ser estudado. Além disso, a inibição da via UPR durante esse processo pode apresentar potencial terapêutico e quimiopreventivo. O uso de substâncias quimiopreventivas já é amplamente utilizado em diversos tipos de câncer, porém a quimioprevenção do câncer bucal ainda não é uma realidade. O ácido docosahexaenóico pode ser uma substância que traga a alternativa da quimioprevenção bucal realizando a modulação do processo de carcinogênese, estacionando a progressão das DPM.

Nesse estudo pretendemos esclarecer o papel da via UPR na carcinogênese, verificando a expressão do GRP78 após o uso do DHA. Vemos na expressão desta via um grande potencial terapêutico futuro, visto que a regulação das proteínas envolvidas nos permite a manipulação da UPR, induzindo ou bloqueando sua ativação, utilizando substâncias quimiopreventivas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Monitorar a ativação de GRP78 ao longo da carcinogênese. Verificar o potencial do ácido docosahexaenóico na inibição da UPR durante a carcinogênese bucal.

3.2 ESPECÍFICOS

- Monitorar *in vivo* a ativação de GRP78 e a proliferação celular ao longo da carcinogênese.
- Avaliar *in vivo* os efeitos do ácido docosahexaenóico durante o processo de Carcinogênese.

4 ARTIGO

Título: EFEITOS DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO NA MODULAÇÃO DA PROTEÍNA REGULADA POR GLICOSE 78 (GRP78) DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL

Periódico: *Carcinogenesis: Integrative Cancer Research*

Online ISSN 1460-2180 - Fator de impacto: 4.004

Autores: Isadora Follak de Souza; Eduardo Liberato da Silva; Ian Santana Machado; Ewelyn de Freitas Farias; Julia da Silveira Nunes; Bianca De Bem Prunes; Taiane Berguemaier de Lima; Arthur Pias Salgueiro; Vinicius Coelho Carrard; Fernanda Visioli.

RESUMO

O câncer bucal se caracteriza por um crescimento desordenado e descontrolado de células, é multifatorial, sendo os principais fatores de risco o fumo e o consumo de álcool. A super-expressão da proteína GRP78 (reguladora da ativação da UPR) já foi detectada em vários tipos de câncer. O ácido Docosahexaenóico (DHA), surgiu como opção de substância quimiopreventiva, pela sua atividade pró-apoptótica, em parte por regular a expressão de GRP78 durante a carcinogênese. O objetivo foi avaliar o efeito do DHA na carcinogênese bucal em ratos Wistar, que foram divididos em 3 grupos: Grupo 1 (controle), Grupo 2 (4NQO+EtOH), Grupo 3 (4NQO+EtOH+DHA). Lesões clinicamente visíveis foram detectadas a partir de 15 semanas. Em 24 semanas, 100% e 91,66% dos animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, respectivamente apresentavam displasia epitelial, sendo a maioria de alto grau no grupo 4NQO+EtOH. A expressão de GRP78 aumentou ao longo do processo de carcinogênese, enquanto no grupo controle os níveis mantiveram-se estáveis. A atividade proliferativa, nos grupos 2 e 3, foi maior, principalmente na camada basal. Assim, concluímos que durante a carcinogênese bucal ocorre um aumento progressivo dos níveis de GRP78 e que a suplementação com DHA diminui seus níveis por um período limitado do processo, o que pode favorecer o desaceleramento da carcinogênese, mas não sua inibição.

Palavras-chave: Oral cancer, Oral carcinogenesis, Unfolded Protein Response, GRP78, Docosahexaenoic acid, chemoprevention.

INTRODUÇÃO

O câncer de boca tem como principal característica o crescimento desordenado e descontrolado de células (1). Sua etiologia é multifatorial, mas os principais fatores de risco são hábitos como consumo de fumo e álcool. A baixa taxa de sobrevivência dos pacientes, acontece principalmente pelo diagnóstico tardio e às limitadas opções de tratamento, precisamos melhorar o entendimento e conhecimento sobre o processo de carcinogênese, buscando formas de prevenção (2–4).

O reconhecimento das desordens potencialmente malignas (DPM), que são alterações clínicas e histopatológicas que podem anteceder o câncer bucal, é importante para o diagnóstico e tratamento precoce dos pacientes. A leucoplasia oral, a mais comum das DPM, é uma lesão definida como “placa ou mancha predominantemente branca, excluindo (outras) doenças ou distúrbios conhecidos que não apresentam risco aumentado de câncer” (5,6). Microscopicamente, podem apresentar diferentes distúrbios de proliferação e diferenciação epiteliais. Displasia epitelial é um termo usado para descrever distúrbios na arquitetura epitelial, acompanhados de atipia celular e perda de estratificação e maturação dos queratinócitos. A detecção de displasia é um dos principais preditores de transformação maligna nos tecidos (7).

Encontrar formas de estacionar o processo que induz ao surgimento das DPM é um desafio, por isso diversas pesquisas buscam mecanismos que atuem desta forma. A quimioprevenção refere-se ao uso de agentes e/ou substâncias para prevenir, interromper ou reverter o processo de transformação maligna das células (8). O uso de substâncias quimiopreventivas já é amplamente utilizado em diversos tipos de câncer, porém a quimioprevenção do câncer bucal ainda não é uma realidade (9). O ácido docosahexaenóico (DHA) pode ser uma alternativa para modular o processo de carcinogênese bucal. Derivado do Ômega 3, faz parte do grupo de ácidos graxos poli-insaturados essenciais (PUFAs), que possuem papel importante na estrutura da membrana celular e sinalização celular (10), e possuem papel anti-inflamatório pela produção de mediadores inibidores de inflamação como protectinas e resolvinas (11). De origem marinha, são obtidos em peixes de água fria, como salmão (12), além de óleo de peixe e algas (13). Estudos apontaram que o DHA é

um protetor para câncer de mama em humanos (14) e em animais (15). Seu consumo foi associado com menores índices de recidiva e mortalidade de câncer de mama em mulheres (16). Além disso, demonstrou efeito protetor para desenvolvimento de câncer de cólon (17) e próstata em modelos animais (18) e *in vitro* (19).

O efeito protetor do DHA está relacionado à sua capacidade de induzir a apoptose e, esta resposta pode estar relacionada com a capacidade de ativar a Unfolded Protein Response (UPR). 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 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 (20). Já foi demonstrado que o DHA causa diminuição da produção da chaperona GRP78. Também na via da UPR foi visto que o DHA causa ativação da caspase-4 e caspase-7 resultando na indução de apoptose (17). Jakobsen, *et al.* (2008) (21) em estudo com linhagens tumorais mostraram que o DHA aumenta os níveis de eIF2a fosforilada para restabelecer a homeostase da síntese proteica, mas que a longo prazo leva as células tumorais à apoptose. Frente as evidências que mostram o papel do DHA como substância quimiopreventiva no processo de carcinogênese, verificamos seu efeito na carcinogênese bucal e a ativação da via UPR neste processo, analisando a expressão do GRP78 após o uso do DHA em modelo animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2017-0521).

Foi realizado um estudo randomizado prospectivo controlado em modelo animal. Foram utilizados 88 ratos wistar machos com idade de aproximadamente 60

dias, pesando aproximadamente 200g no início do estudo. Os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais, avaliados em três tempos diferentes, randomizados considerando seus pesos iniciais.

Indução da carcinogênese

A indução da carcinogênese foi realizada através da exposição ao álcool etílico e 4NQO (Figura 1).

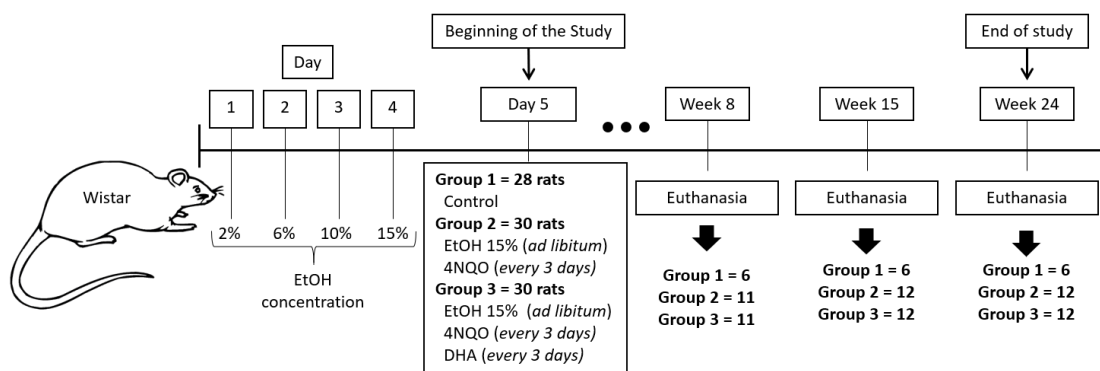


Figura 1. Linha do tempo representando tempos experimentais e a divisão dos grupos

Álcool etílico (EtOH) – Após a ambientação dos animais, a fase de adaptação da ingestão alcoólica foi iniciada, sendo administradas as concentrações de 2%, 6%, 10%, e então 15% (diluído em água), durante o período de um dia para cada concentração (22,23). Após período de adaptação, a concentração de 15% de EtOH se manteve durante todos os tempos experimentais, sendo a única fonte líquida dos animais dos grupos 2 e 3.

4NQO – Para a aplicação do 4NQO (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) diluído a 0,5% em propilenoglicol, foi utilizado um microbrush individual e descartável, pincelado na língua, três vezes por semana durante o tempo experimental nos grupos 2 e 3. Enquanto no grupo controle foi aplicado somente o propilenoglicol nas mesmas condições dos grupos teste.

Tratamento com DHA

Os animais do grupo 3, receberam óleo de peixe enriquecido com DHA, na dose de 240mg/Kg (24) da substância, via gavagem, três vezes por semana.

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 ou úlcera. O comprimento e largura das lesões observadas clinicamente foram mensurados e fotografadas com distância padronizada. O tamanho das lesões foi expresso em mm², sendo a frequência das lesões registrada para cada grupo em cada tempo experimental, e avaliadas por um observador cego e calibrado.

Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados no final dos tempos experimentais referentes a cada grupo seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (2013), através de sobre dose 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 coleta de sangue foi realizada via punção cardíaca anteriormente a eutanásia mediante anestesia geral. No momento após a eutanásia, as línguas foram removidas cirurgicamente, fotografadas e avaliadas macroscopicamente novamente.

Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais e análise clínica, as línguas foram imersas em solução de formalina neutra tamponada 10% 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 e carcinoma espinocelular (6). Além disso, as displasias epiteliais foram classificadas segundo o Sistema Binário (25). A frequência de cada tipo de lesão foi registrada para cada grupo. No grupo controle, a mucosa do bordo da língua foi utilizada como referência para análise histopatológica. Para validar a análise da classificação das lâminas, as mesmas foram avaliadas em dois tempos diferentes com intervalo de tempo de 5 dias pelo mesmo examinador.

Para a avaliação do infiltrado inflamatório presente nas lâminas foram avaliados 10 campos aleatórios de cada lâmina a partir de captura de imagens. A

contagem das células ocorreu na região subepitelial, diferenciando linfócitos, plasmócitos e neutrófilos.

Imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, foram utilizados o anticorpo primário Anti-HSPA5 (GRP78) (concentração 1:400, HPA038846, clone 4E3, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e o anticorpo anti-Ki-67 (concentração 1:200, clone16667, Abcam, Cambridge, MA, EUA). Como controle positivo foi utilizada uma amostra humana de carcinoma espinocelular bucal previamente testada para estes anticorpos. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por PBS.

Para avaliação do Ki-67, foram quantificadas as células positivas na camada basal e parabasal, em um total de 1000 células em cada camada, calculando-se o percentual de células positivas para cada camada. Já para avaliar a marcação do GRP78 foram consideradas a intensidade da marcação, sendo zero (sem marcação), 1 (marcação leve), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação intensa), e também o percentual de células marcadas, classificando 0 (até 5% de células positivas), 1 (até 25% de células positivas), 2 (entre 26 e 50% de células positivas), 3 (entre 51 e 75% de células positivas) e 4 (entre 76 e 100% de células positivas). Ao final os escores de intensidade e de percentual foram multiplicados para formar o escore final de GRP78 (26).

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. Foram testadas a normalidade da distribuição dos dados obtidos para escolha do teste mais adequado. Quando 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

Acompanhamento dos animais

Os animais foram pesados semanalmente. O peso inicial médio foi de 343g. Ao longo de todo o período experimental não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA de duas vias, $p > 0.05$) (Figura s1 – suplementar). 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 s1 - Suplementar). Os níveis de colesterol e triglicerídeos dos animais foram analisados, sem diferenças estatisticamente significativas. (Figura s2 - Suplementar).

Avaliação clínica das lesões

No momento da eutanásia foram realizadas fotografias das línguas e a presença das lesões foi avaliada (Figura 2). No tempo experimental de 8 semanas, nenhuma lesão foi detectada. Em 15 semanas, duas placas brancas foram observadas, uma no grupo 4NQO+EtOH e outra no grupo 4NQO+EtOH+DHA, e ambas em dorso posterior de língua. Em 24 semanas, todos os animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA 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 1). Nenhum animal do grupo controle apresentou lesão em nenhum dos tempos experimentais avaliados.

Avaliação histopatológica

Na análise microscópica de 8 semanas, em torno de 45% e 63% dos animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, respectivamente já apresentam alterações epiteliais, sendo essas em sua maioria de hiperkeratose. Em 15 semanas, 81% e 91% dos animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, respectivamente apresentam alterações epiteliais, na maioria hiperkeratose isolada ou associada à hiperplasia epitelial. Em 24 semanas, 100% e 91,66% dos animais dos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, respectivamente apresentavam displasia epitelial (Tabela 1 – Figura 3).

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

Avaliação das células inflamatórias

No tempo de 24 semanas foi realizada a quantificação de células inflamatórias na mucosa da língua. Foram encontrados um número pequeno de neutrófilos e plasmócitos em todos os grupos experimentais. Já os linfócitos foram encontrados em maior número, sendo significativamente superior nos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, mas sem diferença entre eles (Figura 4A).

Avaliação da ativação de GRP78 e da proliferação celular ao longo da carcinogênese.

Foi detectado que a expressão de GRP78 aumentou ao longo do processo de carcinogênese, enquanto no grupo controle os níveis de GRP78 se mantiveram estáveis (Figura 3). Apesar de não ser significativo, nos tempos 8 e 15 semanas a expressão de GRP78 foi menor no grupo que recebeu DHA. No entanto, em 24 semanas os grupos testes apresentaram expressão semelhante (Figura 4B).

Quanto à atividade proliferativa, pela contagem das células positivas para o marcador Ki67, nos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA onde a carcinogênese foi induzida, encontramos uma maior atividade proliferativa, principalmente na camada basal. Essa atividade foi maior no grupo 4NQO+EtOH, visto o resultado estatisticamente superior ao controle (Figura 3 e 4C).

Tabela 1. Número e área média dos diferentes tipos de lesões observadas de acordo com os grupos. p , Teste t. e Diagnóstico histopatológico das línguas dos animais de acordo com o grupo e com o tempo experimental e Subclassificação das displasias epiteliais.

		15 weeks				24 weeks				p (TEST t) 24 weeks	
		4NQO+EtOH		4NQO+EtOH+DHA		4NQO+EtOH		4NQO+EtOH+DHA			
		n	Area (mm ²)	n	Area (mm ²)	N	Area (mm ²)	n	Area (mm ²)		
Clinical aspects	White Spot	0	-	0	-	14	0,057 (±0,03)	15	0,064 (±0,04)	0,68	
	White plaque	1	0,13	1	0,33	11	0,215 (±0,15)	10	0,133 (±0,08)	0,15	
	Leukoerythroplasia	0	-	0	-	11	2,089 (±0,58)	11	2,191 (±0,44)	0,64	
Histopathologic al aspects	No alterations	2 (18,18%)		1 (9,09%)		-		-			
	Hyperkeratosis (HC)	1 (9,09%)		5 (45,45%)		-		-			
	HP + HC	6 (54,54%)		1 (9,09%)		-		1 (8,33%)			
	Epithelial Dysplasia	2 (18,18%)		4 (36,36%)		12 (100%)		11 (91,66%)			
	Binary system	Low	2 (18,18%)		3 (27,27%)		2 (16,66%)		6 (50%)		
		High	0 (0%)		1 (9,09%)		10 (83,3%)		5 (41,66%)		



Figura 2. Imagens representativas das línguas dos animais do tempo experimental de 24 semanas. A, grupo controle sem lesão clinicamente visível. B, grupo 4NQO+EtOH com placa branca em dorso de língua. C, grupo 4NQO+EtOH com leucoeritroplasia em borda lateral direita de língua.

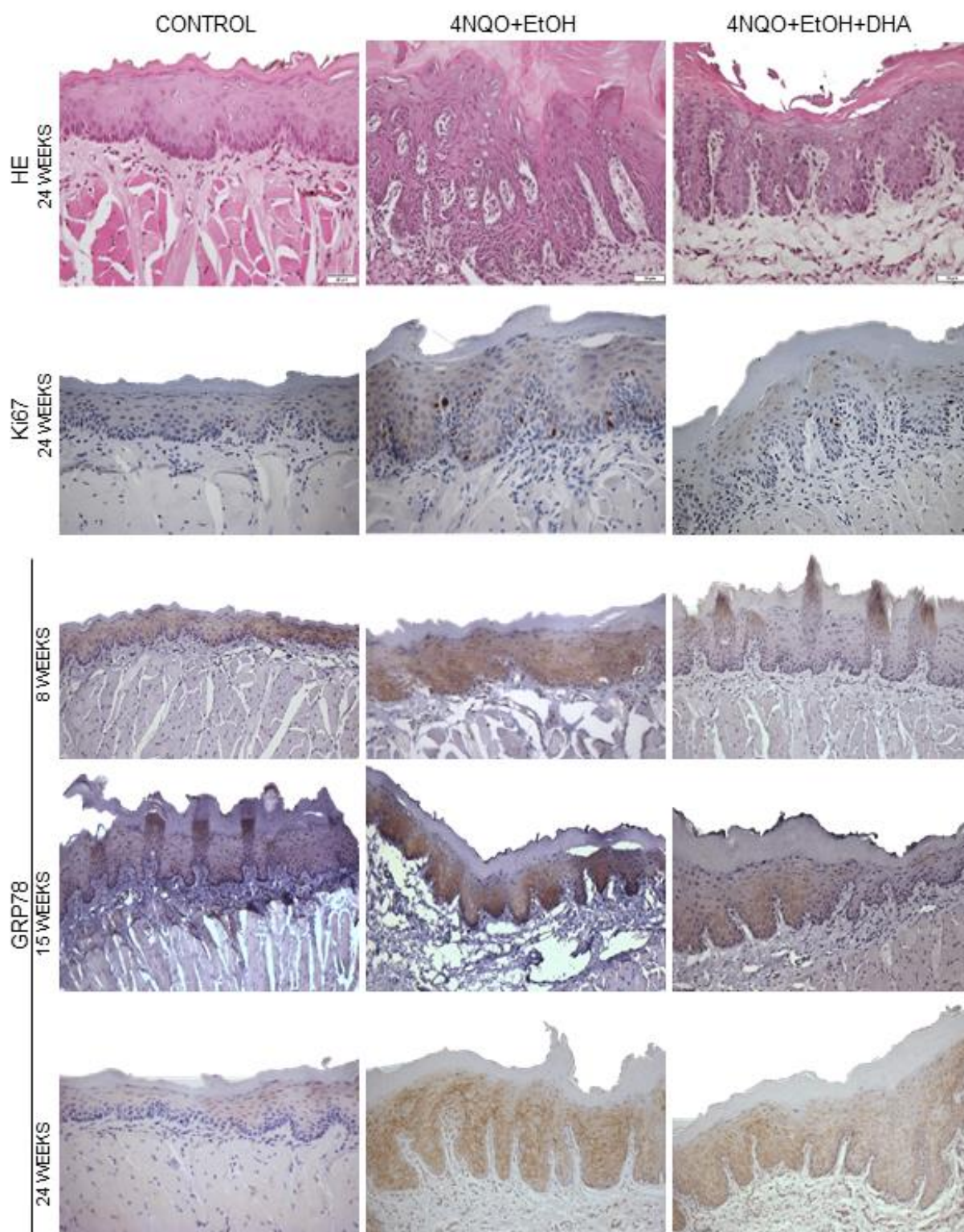


Figura 3. Imagens microscópicas representativas das línguas dos animais nos três grupos, no controle (sem alterações), no 4NQO+EtOH (displasia de alto grau), e no grupo 4NQO+EtOH+DHA (displasia de baixo grau). Em HE no tempo de 24 semanas. A imunomarcagem para Ki67 também no tempo de 24 semanas. E para o GRP78 durante os três tempos experimentais: 8, 15 e 24 semanas.

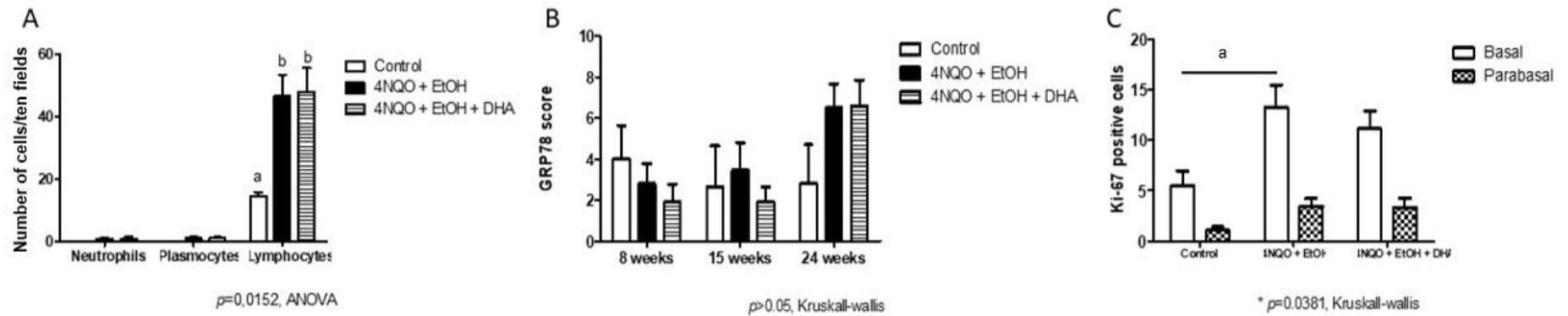


Figura 4. Resultados: A) Quantificação de células inflamatórias no tempo de 24 semanas. p, teste ANOVA; B) da avaliação da presença do GRP78 em cada grupo e tempos experimentais. p, teste Kruskal-wallis; C) Dos níveis de proliferação celular (Ki-67). p, teste Kruskal-wallis.

DISCUSSÃO

Ainda que os efeitos do consumo de ômega 3 e seus derivados tenham sido amplamente explorados na carcinogênese mamária (14), é a primeira vez que o efeito do DHA na carcinogênese bucal está sendo estudado. Portanto, utilizamos neste estudo um modelo animal de carcinogênese bucal para avaliar os efeitos da suplementação com DHA (17). Ao final do tempo experimental, tanto o grupo 4NQO+EtOH quanto o 4NQO+EtOH+DHA apresentavam 100% e 91,66% de lesões displásicas na mucosa lingual exposta aos carcinógenos 4-NQO e à solução alcóolica, respectivamente. Detectamos maior quantidade de lesões de alto grau no grupo 4NQO+EtOH, o que sugere que o DHA pode desacelerar o processo da carcinogênese, mas não é capaz inibi-la. Quando observamos os níveis proteicos de GRP78 no grupo que recebeu a suplementação com DHA, observamos que estes são menores que o grupo controle e que o grupo 4NQO+EtOH, confirmando a capacidade do DHA em diminuir a expressão de GRP78. Porém em 24 semanas, os níveis de GRP78 aumentam também no grupo 4NQO+EtOH+DHA de forma semelhante ao grupo que não recebeu DHA, possivelmente porque com a persistência do estímulo nocivo ocorre um acúmulo progressivo de mutações, causando grande estresse no retículo endoplasmático e assim, apenas a suplementação com DHA não é suficiente para impedir a ativação da UPR. Ainda não está demonstrado como e quais seriam os mecanismos moleculares envolvidos na inibição de GRP78 pelo DHA, dessa forma, não temos como afirmar como ocorreu a modulação da ativação de GRP78 neste modelo.

A carcinogênese e os mecanismos que levam as células à transformação maligna são complexos e ainda pouco compreendidos. A quimioprevenção usando diversos tipos de substâncias já é utilizada em alguns tipos de câncer, porém a quimioprevenção do câncer bucal ainda não é uma realidade. Sabendo que a expressão da UPR por meio da ativação da chaperona GRP78, para a sobrevivência das células tumorais já está bem estabelecida (27), mas o seu papel durante o processo de transformação maligna ainda não, vimos a importância de relacionar a inibição dessa via com um possível potencial terapêutico e quimiopreventivo (28). Para realizar essa modulação, encontramos na literatura o uso do DHA, um inibidor

natural do GRP78, que apresentou resultados positivos em outros tipos de câncer (17,29), podendo ser uma alternativa para modular o processo da carcinogênese bucal, estacionando a progressão das DPM.

Com o uso do modelo animal com administração do 4NQO+EtOH observamos que os níveis proteicos de GRP78 aumentaram durante o processo de carcinogênese, de acordo com o resultado do grupo 4NQO+EtOH. O aumento da chaperona GRP78 é um indicativo de ativação da via de sinalização UPR durante esse processo (30). Esse resultado era esperado, pois sabemos que ao longo da carcinogênese há o acúmulo de mutações genéticas, que muitas vezes resultam em proteínas que não podem ser dobradas corretamente. Além disso, o aumento da atividade proliferativa resulta em um aumento significativo da síntese proteica celular que pode ultrapassar a capacidade de processamento das proteínas nascentes no lúmen do retículo endoplasmático rugoso, sítio celular responsável pelo processamento de proteínas que fazem parte das membranas celulares (31). A ativação da UPR e aumento da expressão das moléculas que a compõem, em especial da chaperona GRP78, já foi observado em vários tipos de câncer: cabeça e pescoço, cólon, gástrico, próstata e mama, por exemplo (30,32–36). Altos níveis de GRP78 foram associados a características clínicas e patológicas adversas, como progressão e proliferação tumoral, pior estadiamento do tumor, metástase linfonodal, recorrência e menores taxas de sobrevida. No entanto, até o momento, não é claro o papel dessa via e dessa chaperona no processo de surgimento e desenvolvimento do câncer (37).

O aumento da expressão da chaperona GRP78 tem sido associada com maior agressividade tumoral, possivelmente por ser uma molécula anti-apoptótica devido à sua capacidade de ligar-se a capazes e inibir sua ativação (38). Dessa forma, as células tornam-se cada vez mais resistentes aos danos sofridos no DNA. Essa capacidade de adaptação ao microambiente tumoral, ao estresse causado pela hipóxia, com indução de autofagia celular e bloqueio da apoptose podem tornar os tumores não só mais agressivos, mas também mais resistentes aos tratamentos antitumorais (39–41). A expressão do GRP78 é considerada preditiva da resistência ao tratamento e recidiva tumoral em muitos tipos de cânceres como no câncer de pâncreas (42), cérebro (36), fígado (34,43) e mama (32). O GRP78 é capaz de

regular a quimiorresistência através de vários ramos da resposta a UPR, bem como através da modulação da via PI3K/AKT (37). Assim, a avaliação da expressão de GRP78 nos tumores pode ser utilizada como um marcador prognóstico para a agressão do tumor e potencialmente prever resistência a terapias padrão (44). Confirmando os dados acima, foi detectado que a combinação de inibidores da UPR, com drogas anticâncer convencionais, pode reduzir a resistência à terapia e aumentar a sensibilidade ao tratamento (45).

O aumento de GRP78 especificamente na carcinogênese bucal já foi demonstrado em um estudo prévio onde foram investigados 204 pacientes com câncer bucal e 86 com DPM. Foi visto que a hiper expressão do GRP78 ocorreu progressivamente com o aumento da severidade das lesões orais, sugerindo que esta molécula desempenha um papel crucial nas etapas iniciais da oncogênese oral (26). A determinação dos níveis de expressão de GRP78 nas DPM pode permitir uma melhor estratificação de risco para pacientes com esta condição, sendo isto, especialmente importante para indivíduos classificados com baixo risco de transformação maligna nas lesões existentes. Diante disso, podemos inferir que GRP78 é um potencial alvo-terapêutico e que sua inibição durante a carcinogênese pode ser um recurso quimiopreventivo.

Uma meta-análise recente concluiu que a redução do risco de câncer de mama em humanos é dose-dependente ao consumo de EPA e DHA, sendo que o consumo de 100 mg por dia reduz o risco em 5% e 300mg por dia reduz em até 14% o risco (31). Assim, é sugerido 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. Assim, uma redução adicional no consumo de ômega 6 seria necessário para efetivamente reduzir os riscos de desenvolver câncer (17,33). Infelizmente, no nosso estudo não foi possível comparar a razão entre ômega 3 e ômega 6 nos diferentes grupos.

Alguns fatores de confusão foram identificados entre os trabalhos, entre eles, a origem do ômega 3 avaliada, que poderia ter sido 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 do não desenvolvimento do 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 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 DHA podem depender, e provavelmente, estejam relacionados com os fatores etiológicos que induzem a carcinogênese.

Além da relação entre os mecanismos de inibição do GRP78, há outros mecanismos que explicam a proteção oferecida pelo uso do DHA já demonstrados na literatura. Na redução do risco de câncer de mama utilizando o tratamento com DHA e EPA já foi detectada a redução da produção de citocinas; redução da expressão de receptores tirosina-quinase como o EGFR (Receptor do fator de Crescimento Epidérmico) (46,47); redução da atividade proliferativa (48); aumento da apoptose pela ativação do receptor GRP120 (49,50) e foi considerado que o DHA e EPA possuem papel anti-inflamatório pela produção de eicosanoides minimamente inflamatórios e mediadores inibidores de inflamação como protectinas e resolvinas (11). Sabendo do papel anti-inflamatório do DHA e, que a inflamação pode apresentar tanto funções pró quanto antitumorais, avaliamos a resposta inflamatória que foi desencadeada na carcinogênese induzida. Observamos aumento de células inflamatórias no tempo 24 semanas nos grupos 4NQO+EtOH e 4NQO+EtOH+DHA, porém sem diferença entre os grupos. Portanto, o efeito protetor exercido pelo DHA não pode ser explicado pelo seu potencial anti-inflamatório.

A fim de testar substâncias potenciais para modular os processos envolvidos na carcinogênese utilizamos modelos animais com a exposição a carcinógenos. O 4NQO é um carcinógeno sintético que 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, ao carcinoma *in situ*, até o carcinoma espinocelular bem diferenciado no modelo animal (51), da mesma forma como encontramos no nosso estudo. Lesões classificadas até como displasias severas foram encontradas, passando por todas as alterações epiteliais prévias. Até o tempo de 24 semanas, não houve o desenvolvimento de carcinomas na nossa amostra, provavelmente pela forma em que aplicamos o 4NQO, de forma tópica, apenas 3 vezes por semana. A indução tumoral é causada pela capacidade que o 4NQO possui de produzir dano no DNA das células, devido ao estresse oxidativo intracelular (52). Para tornar esse modelo mais fidedigno ao processo de carcinogênese bucal, é utilizado o etanol concomitantemente. A função específica do álcool neste processo ainda não está totalmente esclarecido (53). Ele pode funcionar como um solvente, que aumenta a permeabilidade dos tecidos e facilita a absorção de outros compostos cancerígenos, especialmente aqueles encontrados no fumo (54,55). O acetaldeído é um subproduto do etanol e é considerado um composto genotóxico, atuando 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 (56). Outras possíveis contribuições do etanol à carcinogênese incluem a produção de radicais livres, deficiências nutricionais e imunológicas (57), considerando a diminuição no consumo de ração nos grupos onde foi induzida a carcinogênese, a deficiência nutricional pode ter sido coadjuvante na indução das lesões. No nosso estudo optamos por realizar a indução tópica do 4NQO, como já citado anteriormente, para que pudéssemos associar a ingestão do etanol na água. Na maioria dos estudos que utilizam essa metodologia, a ingestão do 4NQO é realizada na água, onde o animal fica em contato direto com a substância, porém a inclusão do etanol fica comprometida. Com o nosso modelo, apesar de menor contato com o 4NQO, conseguimos reproduzir a associação tabaco mais etanol. No entanto, é importante considerar que mesmo assim, o modelo animal não reflete

completamente a complexidade da carcinogênese no ser humano e esta é uma limitação importante deste estudo. Além de mais estudos experimentais testando novos protocolos de administração (dose/tempo) do DHA, são necessários estudos epidemiológicos, com tamanhos amostrais grandes suficientes para identificar se dietas ricas em DHA conferem proteção contra o câncer de boca.

De acordo com os achados observados neste estudo podemos concluir que durante a carcinogênese bucal ocorre um aumento progressivo dos níveis proteicos da chaperona GRP78 e que a suplementação com DHA diminui os níveis de GRP78 por um período limitado do processo, o que pode favorecer o desaceleramento da carcinogênese, mas não a inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA (2016) , O que é o câncer? - INCA. . [Online]. Available: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. [Accessed: 01-Aug-2016].
2. Warnakulasuriya, S. (2010) Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncology*, **46**, 407–410.
3. Kumar, M. *et al.* (2016) Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*, **12**, 458–463.
4. Sidhu, A. *et al.* (2015) Borrelidin Induces the Unfolded Protein Response in Oral Cancer Cells and Chop-Dependent Apoptosis. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **6**, 1122–1127.
5. van der Waal, I. (2009) Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.*, **45**, 317–323.
6. Warnakulasuriya, S. *et al.* (2007) Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.*, **36**, 575–580.
7. Mustafa, M.B. *et al.* (2019) Oral leukoplakia in the Sudan: clinicopathological features and risk factors. *Int Dent J*, DOI: 10.1111/idj.12509.
8. Monteiro de Oliveira Novaes, J.A. *et al.* (2016) Prognostic factors, predictive markers and cancer biology: the triad for successful oral cancer chemoprevention. *Future Oncol*, **12**, 2379–2386.
9. Xie, A. *et al.* (2017) Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis. *J Pak Med Assoc*, **67**, 1415–1419.
10. Calder, P.C. (2011) Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol.*, **668 Suppl 1**, S50-58.

11. Rose, D.P. *et al.* (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.*, **83**, 217–244.
12. Russo, G.L. (2009) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 937–946.
13. Bougnoux, P. *et al.* (2009) Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br. J. Cancer*, **101**, 1978–1985.
14. Shannon, J. *et al.* (2007) Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 1090–1097.
15. Signori, C. *et al.* (2011) Chemoprevention of breast cancer by fish oil in preclinical models: trials and tribulations. *Cancer Res.*, **71**, 6091–6096.
16. Patterson, R.E. *et al.* (2011) Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis. *J. Nutr.*, **141**, 201–206.
17. Fasano, E. *et al.* (2012) DHA induces apoptosis by altering the expression and cellular location of GRP78 in colon cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1762–1772.
18. Zhang, Z. *et al.* (2016) Effects of ω -3 Fatty Acids and Catechins on Fatty Acid Synthase in the Prostate: A Randomized Controlled Trial. *Nutr Cancer*, DOI: 10.1080/01635581.2016.1224365.
19. Li, C.-C. *et al.* (2014) Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Induced by Tumor-Associated Macrophages. *PLoS One*, **9**,
20. Lee, A.S. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, **35**, 373–381.

21. Jakobsen, C.H. *et al.* (2008) DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J. Lipid Res.*, **49**, 2089–2100.
22. McMillen, B.A. *et al.* (2005) Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. *Alcohol Alcohol.*, **40**, 494–497.
23. Carrard, V.C. *et al.* (2009) Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 1058–1063.
24. Parada, B. *et al.* (2013) Omega-3 fatty acids inhibit tumor growth in a rat model of bladder cancer. *Biomed Res Int*, **2013**, 368178.
25. Kujan, O. *et al.* (2006) Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.*, **42**, 987–993.
26. Lin, C.-Y. *et al.* (2010) Positive association of glucose-regulated protein 78 during oral cancer progression and the prognostic value in oral precancerous lesions. *Head Neck*, **32**, 1028–1039.
27. Wang, M. *et al.* (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 581–597.
28. Peñaranda Fajardo, N.M. *et al.* (2016) The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.*, **118**, 1–8.
29. Suzuki, E. *et al.* (2018) Docosahexaenoic Acid Reduces Palmitic Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic B Cells. *Kobe J Med Sci*, **64**, E43–E55.
30. Dicks, N. *et al.* (2015) Endoplasmic Reticulum Stress, Genome Damage, and Cancer. *Front. Oncol.*, **5**,

31. Cerezo, M. *et al.* (2017) New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. *Autophagy*, **13**, 216–217.
32. Yang, C. *et al.* (2019) Expression of glucose-regulated protein 78 as prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Histol. Histopathol.*, DOI: 10.14670/HH-18-185.
33. Xing, X. *et al.* (2006) Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin. Chim. Acta*, **364**, 308–315.
34. Zheng, H. *et al.* (2008) Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum. Pathol.*, **39**, 1042–1049.
35. Daneshmand, S. *et al.* (2007) Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum. Pathol.*, **38**, 1547–1552.
36. Pyrko, P. *et al.* (2007) The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Res*, **67**, 9809–9816.
37. Li, Z. *et al.* (2012) Glucose regulated protein 78: a critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks. *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 13–22.
38. Visioli, F. *et al.* (2014) Glucose-Regulated Protein 78 (Grp78) Confers Chemoresistance to Tumor Endothelial Cells under Acidic Stress. *PLOS ONE*, **9**, e101053.
39. Luo, B. *et al.* (2013) The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, **32**, 805–818.
40. Chevet, E. *et al.* (2015) Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov*, **5**, 586–597.

41. Bu, Y. *et al.* (2016) PERK Integrates Oncogenic Signaling and Cell Survival During Cancer Development. *J. Cell. Physiol.*, **231**, 2088–2096.
42. Gifford, J.B. *et al.* (2016) Expression of GRP78, Master Regulator of the Unfolded Protein Response, Increases Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.*, **15**, 1043–1052.
43. Su, R. *et al.* (2010) Grp78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, **10**, 20.
44. Gifford, J.B. *et al.* (2018) GRP78 Influences Chemoresistance and Prognosis in Cancer. *Curr Drug Targets*, **19**, 701–708.
45. Nagelkerke, A. *et al.* (2014) The unfolded protein response as a target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1846**, 277–284.
46. Rogers, K.R. *et al.* (2010) Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis*, **31**, 1523–1530.
47. Ravacci, G.R. *et al.* (2013) Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression. *J. Nutr. Biochem.*, **24**, 505–515.
48. Manna, S. *et al.* (2010) Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER-2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis. *Clin Nutr*, **29**, 531–537.
49. Calder, P.C. (2013) n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc*, **72**, 326–336.
50. Fabian, C.J. *et al.* (2015) Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Res.*, **17**, 62.
51. Prime, S.S. *et al.* (1986) Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. *J. Oral Pathol.*, **15**, 280–283.

52. Tanaka, T. *et al.* (2002) Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **23**, 1361–1367.
53. Osei-Sarfo, K. *et al.* (2013) The molecular features of tongue epithelium treated with the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide and alcohol as a model for HNSCC. *Carcinogenesis*, **34**, 2673–2681.
54. Howie, N.M. *et al.* (2001) Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis*, **7**, 349–354.
55. Seitz, H.K. *et al.* (2007) Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 599–612.
56. Seitz, H.K. *et al.* (2010) Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr*, **5**, 121–128.
57. Boffetta, P. *et al.* (2006) Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.*, **7**, 149–156.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Peso dos animais

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 s1). Ao longo de todo o período experimental não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA de duas vias, $p > 0.05$).

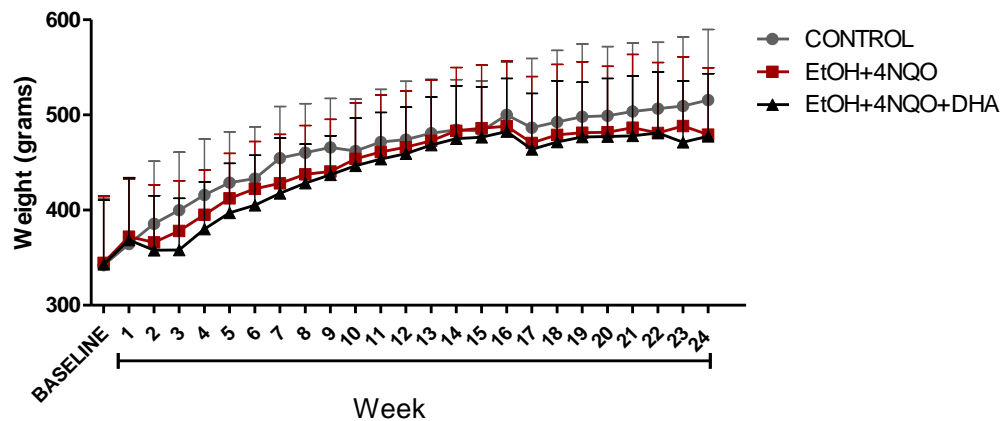


Figura s1. Variação do peso dos animais (gramas) ao longo do estudo.

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 s1).

Tabela s1. Média e Desvio-padrão do consumo semanal de ração e líquidos por caixa de animal de acordo com o grupo.

Average weekly consumption (per box)	Control (group 1)	4NQO + EtOH (group 2)	4NQO + EtOH+ DHA (group 3)	<i>p</i> (ANOVA)
Feed (grams)	307.61 (±37.27) a	205.39 (±30.66) b	179.11 (±35.01) b	$p < 0.001$
Liquids (milliliters)	540.06 (±76.82) a	308.14 (±76.56) b	281.45 (±70.81) b	$p = 0.0002$

Quantificação dos níveis de colesterol e triglicerídeos dos animais

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 s2A). Em relação ao colesterol HDL não houve diferença em nenhum tempo avaliado (Figura s2B). Observamos aumento dos níveis de triglicerídeos no tempo intermediário (15 semanas), mas que retornou a valores semelhantes na última coleta (Figura s2C).

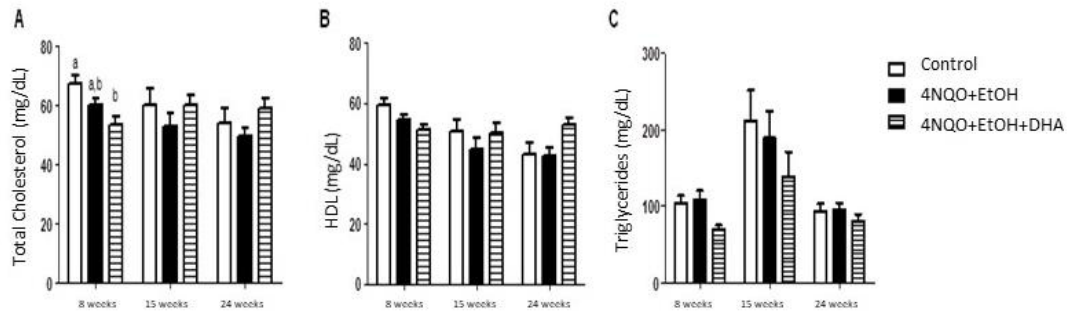


Figura s2. Níveis de colesterol total (A), HDL (B) e triglicerídeos (C) do sangue coletado nos diferentes tempos experimentais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo da carcinogênese bucal é complexo e os mecanismos que levam à transformação maligna das células não são bem compreendidos. A elucidação das lesões clínicas e histopatológicas que ocorrem previamente ao carcinoma espinocelular bucal e suas evoluções é crucial para o diagnóstico e tratamento precoce dos pacientes. Em função da alta taxa de mortalidade devido à baixa resposta aos tratamentos, sabemos que a prevenção é a melhor opção para os pacientes. Além da prevenção primária com abordagens para inibir a exposição aos fatores de risco, fumo e do álcool, medidas de prevenção secundária também são importantes (ZHANG et al., 2012). Por isso o uso de substâncias que tenham efeitos protetores e preventivos que atuem nesse processo podem ajudar na abordagem de indivíduos que apresentam desordens potencialmente malignas. O uso de substâncias quimiopreventivas já é utilizado em diversos tipos de câncer, porém a quimioprevenção do câncer bucal ainda não é uma realidade. Um exemplo de sucesso na quimioprevenção é o uso de aspirina nas lesões do trato gastrointestinal (KRSTIC et al., 2019; PATTERSON; COLBERT MARESSO; HAWK, 2013), dessa forma, a busca por substâncias que tenham efeito no processo da carcinogênese bucal se faz cada vez mais necessária. A identificação de substâncias potenciais é baseada nas alterações moleculares e de vias de sinalização que são ativadas durante a carcinogênese.

A UPR, expressa por meio do seu regulador principal GRP78, é fundamental para a sobrevivência das células no estressante microambiente que surge durante o desenvolvimento do câncer. A ativação da UPR permite que as células mantenham a homeostase proteica mesmo com aumento significativo da proliferação celular e na ausência das condições ideais para síntese e processamento proteico. Assim a inibição da via UPR durante esse processo pode apresentar potencial quimiopreventivo, pois pode eliminar especificamente as células que estão estressadas enquanto as células normais não seriam afetadas. Frente ao exposto e ao conhecimento prévio, vemos na expressão do GRP78, um grande potencial terapêutico futuro, visto que a regulação das proteínas envolvidas nos permite a manipulação da UPR, induzindo ou bloqueando sua ativação. Para tanto, o ácido

docosahexaenóico foi estudado como uma alternativa para modular o processo de carcinogênese bucal, estacionando a progressão das DPM.

Neste estudo a indução da carcinogênese causou um aumento progressivo dos níveis proteicos de GRP78 e a suplementação com DHA diminui esses níveis por um período do processo, o que pode favorecer o desaceleramento da carcinogênese. Portanto, mais estudos utilizando essa relação, com períodos diferentes de indução e dose alternativas do DHA se fazem necessários para confirmar seu potencial quimiopreventivo no câncer de boca.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, W. B. et al. Bowman birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 6, n. 5, p. 410–418, maio 2013.

BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **The Lancet. Oncology**, v. 7, n. 2, p. 149–156, fev. 2006.

BOUGNOUX, P. et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 12, p. 1978–1985, 15 dez. 2009.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev. bras. cancerol**, v. 53, n. 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**, v. 58, n. 7, p. 1408–1416, 1 abr. 1998.

BU, Y.; DIEHL, J. A. PERK Integrates Oncogenic Signaling and Cell Survival During Cancer Development. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 10, p. 2088–2096, out. 2016.

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

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 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**, v. 72, n. 3, p. 326–336, ago. 2013b.

CAO, Y. et al. The Population Impact of Long-term Use of Aspirin and Risk of Cancer. **JAMA oncology**, v. 2, n. 6, p. 762–769, 1 jun. 2016.

CHAU, L. et al. Topical agents for oral cancer chemoprevention: A systematic review of the literature. **Oral Oncology**, v. 67, p. 153–159, 2017.

CHEVET, E.; HETZ, C.; SAMALI, A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 6, p. 586–597, jun. 2015.

CHUBAK, J. et al. Aspirin for the Prevention of Cancer Incidence and Mortality: Systematic Evidence Reviews for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 12, p. 814–825, 21 jun. 2016.

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

DONG, D. et al. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5785–5791, 1 jul. 2005.

FABIAN, C. J. et al. Modulation of Breast Cancer Risk Biomarkers by High-Dose Omega-3 Fatty Acids: Phase II Pilot Study in Premenopausal Women. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 8, n. 10, p. 912–921, out. 2015.

FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F.; HURSTING, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. **Breast cancer research: BCR**, 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**, v. 1822, n. 11, p. 1762–1772, nov. 2012.

FENTON, W. A.; HORWICH, A. L. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 36, n. 2, p. 229–256, maio 2003.

GAO, K. et al. Synergistic anticancer properties of docosahexaenoic acid and 5-fluorouracil through interference with energy metabolism and cell cycle arrest in human gastric cancer cell line AGS cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 10, p. 2971–2980, 14 mar. 2016.

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

GRANCI, V. et al. Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 7, p. 1188–1195, 14 abr. 2013.

GUCALP, A. et al. A Randomized Multicenter Phase II Study of Docosahexaenoic Acid in Patients with a History of Breast Cancer, Premalignant Lesions, or Benign Breast Disease. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 11, n. 4, p. 203–214, 2018.

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**, 14 set. 2016.

HONG, W. K. et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 24, p. 1501–1505, 11 dez. 1986.

HONG, W. K. et al. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 12, p. 795–801, 20 set. 1990.

HOWIE, N. M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Diseases**, v. 7, n. 6, p. 349–354, nov. 2001.

INCA. **O que é o câncer?** - INCA. 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, n. 5, p. 483–494, out. 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, n. 10, p. 2089–2100, out. 2008.

KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 10, p. 1389–1398, 15 nov. 2002.

KRSTIC, M. N. et al. General Aspects of Primary Cancer Prevention. **Digestive Diseases (Basel, Switzerland)**, v. 37, n. 5, p. 406–415, 2019.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 458–463, jun. 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, n. 4, p. 373–381, abr. 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, n. 4, p. 991–998, abr. 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, n. 6, 12 jun. 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, n. 8, p. 1028–1039, ago. 2010.

LIN, Y.-S. et al. Aspirin associated with risk reduction of secondary primary cancer for patients with head and neck cancer: A population-based analysis. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0199014, 2018.

LIPPMAN, S. M. et al. Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 1, p. 15–20, 7 jan. 1993.

LUO, B.; LEE, A. S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 805–818, 14 fev. 2013.

MALLERY, S. R. et al. Topical application of a mucoadhesive freeze-dried black raspberry gel induces clinical and histologic regression and reduces loss of heterozygosity events in premalignant oral intraepithelial lesions: results from a multicentered, placebo-controlled clinical trial. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 7, p. 1910–1924, 1 abr. 2014.

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, n. 4, p. 531–537, ago. 2010.

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.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 448–460, maio 2006.

MONTEIRO DE OLIVEIRA NOVAES, J. A.; WILLIAM, W. N. Prognostic factors, predictive markers and cancer biology: the triad for successful oral cancer chemoprevention. **Future Oncology (London, England)**, v. 12, n. 20, p. 2379–2386, out. 2016.

MUSTAFA, M. B. et al. Oral leukoplakia in the Sudan: clinicopathological features and risk factors. **International Dental Journal**, 12 ago. 2019.

NAGAO, T. et al. Treatment of oral leukoplakia with a low-dose of beta-carotene and vitamin C supplements: a randomized controlled trial. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 7, p. 1708–1717, 1 abr. 2015.

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.

NIU, Z. et al. Elevated GRP78 expression is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. **Scientific Reports**, v. 5, 4 nov. 2015.

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, n. 11, p. 2673–2681, nov. 2013.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A. et al. Pilot randomized phase II study of celecoxib in oral premalignant lesions. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 7, p. 2095–2101, 1 abr. 2008.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A. et al. Randomized Trial of 13-cis Retinoic Acid Compared With Retinyl Palmitate With or Without Beta-Carotene in Oral Premalignancy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 4, p. 599–604, 1 fev. 2009.

PARK, H.-R. et al. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 17, p. 1300–1310, 1 set. 2004.

PATTERSON, R. E. et al. Marine fatty acid intake is associated with breast cancer prognosis. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 2, p. 201–206, fev. 2011.

PATTERSON, S. L.; COLBERT MARESSO, K.; HAWK, E. Cancer chemoprevention: successes and failures. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 94–101, jan. 2013.

PEREIRA, M. C. et al. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. v. 73, n. 4, 2007.

PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**, v. 39, n. 8, p. 770–780, dez. 2003.

PÖSCHL, G.; SEITZ, H. K. Alcohol and cancer. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 39, n. 3, p. 155–165, jun. 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, n. 5, p. 280–283, maio 1986.

RANI, I.; VAIPHEI, K.; AGNIHOTRI, N. Supplementation of fish oil augments efficacy and attenuates toxicity of 5-fluorouracil in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 309–322, ago. 2014.

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, n. 3, p. 505–515, mar. 2013.

REDDY, R. K. et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20915–20924, 6 jun. 2003.

ROGERS, K. R. et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1523–1530, set. 2010.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 519–529, jul. 2007.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 3, p. 217–244, set. 1999.

ROTHWELL, P. M. et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9759, p. 31–41, 1 jan. 2011.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 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, n. 10, p. 469–476, out. 2007.

SAIBIL, H. R. Chaperone machines in action. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 1, p. 35–42, fev. 2008.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**, v. 569, n. 1–2, p. 29–63, 6 jan. 2005.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 8, p. 599–612, ago. 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, n. 2, p. 121–128, jun. 2010.

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, n. 4, p. 1090–1097, abr. 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, n. 11, p. 1122–1127, 12 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, 1 out. 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, n. 7, 24 jul. 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, n. 9, p. 2111–2122, 1 maio 2006.

SZEGEZDI, E. et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO reports**, v. 7, n. 9, p. 880–885, set. 2006.

TANAKA, T. et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 8, p. 1361–1367, ago. 2002.

TSAO, A. S. et al. Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 2, n. 11, p. 931–941, nov. 2009.

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, n. 5, p. 983–994, nov. 2002.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, maio 2009.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. **Nature Reviews. Cancer**, v. 14, n. 9, p. 581–597, set. 2014.

WANG, W.; GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. v. 1843, n. 10, p. 2143–2149, out. 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, jun. 2010.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 45, n. 3, p. 155–166, mar. 2016.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 36, n. 10, p. 575–580, nov. 2007.

WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, n. 1, p. 57–63, maio 2008.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. **CHEMOPREVENTION OF CANCER**, v. 45, p. 9, 1985.

WILLIAM, W. N. et al. Erlotinib and the Risk of Oral Cancer. **JAMA oncology**, v. 2, n. 2, p. 209–216, 1 fev. 2016.

XIE, A.; LIU, J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 67, n. 9, p. 1415–1419, set. 2017.

YE, X. et al. Frequency-Risk and Duration-Risk Relationships between Aspirin Use and Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e71522, 30 jul. 2013.

ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 9, p. 1081–1089, set. 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, 20 set. 2016.