



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DAYRINE SILVEIRA DE PAULA

**EFEITO DA MODULAÇÃO IMUNE POR ABATACEPT EM MODELO DE
CARCINOGENESE ORAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA-N-ÓXIDO**

FORTALEZA

2021

DAYRINE SILVEIRA DE PAULA

**EFEITO DA MODULAÇÃO IMUNE POR ABATACEPT EM MODELO DE
CARCINOGENESE ORAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA-N-ÓXIDO**

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Clínica Odontológica;
Área Temática: Estomatopatologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula
Negreiros Nunes Alves

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P346e Paula, Dayrine Silveira de.
Efeito da modulação imune por abatacept em modelo de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina-n-óxido / Dayrine Silveira de Paula. – 2021.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Abatacepte. 2. Linfócitos T. 3. Carcinogênese. 4. Carcinoma de Células Escamosas. 5. 4-Nitroquinolina-1-Óxido. I. Título.

CDD 617.6

DAYRINE SILVEIRA DE PAULA

**EFEITO DA MODULAÇÃO IMUNE POR ABATACEPT EM MODELO DE
CARCINOGENESE ORAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA-N-ÓXIDO**

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Clínica Odontológica;
Área Temática: Estomatopatologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula
Negreiros Nunes Alves

Aprovada em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Bruno Rocha da Silva
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves
Universidade Federal do Ceará - Sobral

FORTALEZA

2021

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, instituição que tive o privilégio de realizar o mestrado acadêmico em Clínica Odontológica, na pessoa do magnífico reitor, prof. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque.

À **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC**, na pessoa de sua diretora, profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará**, na pessoa da coordenadora, profa. Cristiane Sá Roriz Fonteles. Tenho uma grande honra em ser aluna de Mestrado do PPGO, que também possibilitou a execução desta pesquisa.

Agradeço aos seus **professores e funcionários**, que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional durante este período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, o autor da minha história, que me fortalece todos os dias e tornou esse sonho possível de ser realizado. A Ele toda honra e toda glória, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Erijânio de Paula e Maria das Graças Silveira de Paula**, meus maiores incentivadores, meus tesouros, exemplos e porto seguro. Responsáveis por me ensinarem princípios que levarei para sempre comigo. Grata por todo apoio, paciência, dedicação, oração e amor dedicados a mim e as meninas. Sou privilegiada de tê-los e por sonharem junto comigo. Além de ter comigo meu maior exemplo de amor a docência e dedicação ao ensino, minha maior e primeira inspiração de professora, obrigada mamãe.

A minhas irmãs, **Parley de Paula e Thelry de Paula**, minhas melhores amigas e companheiras. Vocês são a expressão do amor de Deus por mim. Obrigada por todo amor e por terem sido minha fortaleza nos momentos de dificuldade, além de se fazerem presentes mesmo a distância.

Ao meu namorado, **Roberto Euclides Fernandes**, presente em todos os momentos, me dando força e me incentivando a perseverar sempre. Grata por toda atenção, amor, paciência e sonhar comigo.

A toda a minha família, por torcerem e acreditarem em mim. Aos meus cunhados, **Otávio Neto e Rodrigo Lima**, meus irmãos mais velhos, por todo apoio nas horas das dificuldades. Em especial ao meu tio **Erivaldo de Paula**, sempre me incentivou desde a infância até hoje, exemplo de bom coração e fé. A minha madrinha, **Edvalda de Paula**, por todo incentivo. A **Marly Paiva e Otávio Paiva**, por todo apoio desde a graduação.

A querida professora e orientadora **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, por toda dedicação e amor pela docência e pesquisa. Por cada aula espetacular ministrada, pelas diversas orientações e resoluções para que a pesquisa pudesse ser realizada com qualidade. Por ensinar a perseverar, mesmo em meio as dificuldades e desenvolver em seus alunos características cruciais, como responsabilidade e resolutividade, tornando-os profissionais de altíssima qualidade. Por ser exemplo de mulher, dentista, pesquisadora e professora, grata por tamanha dedicação e por se doar em cada pesquisa e ensino, um grande privilégio aprender ao seu lado.

Ao querido professor **Paulo Goberlânio de Barros Silva**, pelo exemplo de humildade e didática. Grata por cada conhecimento compartilhado, pela paciência e amor ao ensinar, além de tamanha dedicação a pesquisa e orientar em todos os momentos. Admiração pela sua forma de ensinar e acreditar na capacidade de aprendizagem dos seus alunos, me inspira sempre a buscar o melhor de mim. Obrigada pelos incentivos nas horas mais precisas.

Ao professor **Mário Rogério Lima Mota**, pelo exemplo de humanidade e intelectualidade. Obrigada pelo ensino e incentivo a pesquisa, além de toda orientação a mim fornecida.

Ao professor **Fabício Bitu Sousa**, pelo profissional humano e justo. Grata por cada ensinamento durante as clínicas de estomatologia, pelo seu jeito inteligente e agregador de atender e repassar a ciência.

Ao professor **Bruno Rocha da Silva**, um orientador incrível que me acompanhou desde o início da graduação. Grata, por ter acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditei, por cada conhecimento compartilhado e ajuda nos momentos difíceis. Obrigada, também pelo carinho e amizade sedimentados ao longo desses anos, além das injeções de ânimo quando eu mais precisei. Sempre será um privilégio ter sido sua aluna e hoje tenho em você além de um extraordinário professor, um grande amigo.

Aos integrantes do **Laboratório de Patologia Bucodental**, em especial as amigas **Maria Elisa Quezado Lima Verde**, **Milena Oliveira Freitas**, **Maria Imaculada Queiroz**, por toda ajuda e apoio na realização da pesquisa, responsáveis por tornar a rotina e o aprendizado mais leve. Obrigada por dividirmos trabalhos, responsabilidades e a diversão, vocês são o real significado de trabalho em equipe. A amiga querida **Cássia Nóbrega Malta**, pelo companheirismo e apoio desde o início dessa jornada, em que tive o privilégio de dividir tantos desafios e momentos felizes.

Aos demais amigos da pós-graduação por toda ajuda e por compartilharmos bons momentos de aprendizado e diversão. Obrigada por toda a solidariedade e apoio nos momentos de inquietação. Destaco, entre os quais, **Joyce Ohana de Lima Martins**, **Guilherme Costa Soares**, **Osias Vieira de Oliveira Filho**, **Pedro Henrique Chaves Isaías**, **João Eudes Teixeira Pinheiro Filho** e **Karine Cestaro Mesquita**.

Aos alunos da iniciação científica, pela indescritível ajuda durante os experimentos e análises. Vocês são essenciais! Obrigada pela parceria, disponibilidade e dedicação de sempre. Em especial, aos alunos, **Manuela da Silva Moreira, Marta Maria Castro Honório e Francisco Dênis Araújo da Silva**, que sem medir esforços estiveram presentes durante os experimentos e análises, mesmo em feriados e recessos. Toda a trajetória se tornou mais leve e possível graças a competência e responsabilidade de vocês. Muito obrigada de coração por se doarem tanto a pesquisa.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Patologia Bucodental, **Alceu Machado Souza**, por toda ajuda nos momentos de maior desespero. Grata pelo seu trabalho de excelência nos cortes histológicos e por cada ensinamento em colorações histológicas e trabalhos laboratoriais.

Aos professores que aceitaram compor as bancas de qualificação, pré defesa e defesa deste trabalho, prof. **Mário Rogério Lima Mota**, profa. **Karuza Maria Alves Pereira**, prof. **Paulo Goberlânio de Barros Silva**, prof. **Filipe Nobre Chaves** e prof. **Bruno Rocha da Silva**. Obrigada pelas contribuições e orientações para este estudo, enriquecendo-o de forma significativa.

Ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)**, pela estrutura de excelência com a qual pude contar durante todo o período do experimento *in vivo* e análises laboratoriais. Campo de grande aprendizado durante todo esse tempo.

Ao **Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)**, em especial ao professor **Roberto César Lima Júnior**, por toda ajuda e pela estrutura para a realização de análises e manipulação de materiais essenciais a pesquisa.

A minha grande amiga, **Ana Beatriz Mendonça Barroso**, mesmo em caminhos tão diferentes, temos o privilégio de dividir nossas alegrias e dificuldades profissionais. Obrigada por ser tão presente e amiga em todo instante, grata por estar sempre na torcida.

As minhas amigas especiais de graduação, em especial a **Lia Vila Real Lima**, minha eterna dupla de faculdade e da vida, grata pela nossa amizade e parceria. Obrigada a **Vanderliza Tomaz Girão e Maria Bruna Vale**, por todo companheirismo e apoio até os dias atuais. Por vibrarem comigo e serem amigas tão presentes.

Enfim, a todos meu muito obrigada, por tanto. Meu coração transborda de **felicidade** e de **gratidão**.

RESUMO

O Abatacept (ABA) é um fármaco que consiste em uma proteína solúvel resultante da fusão do fragmento constante da IgG1 humana e uma molécula CTLA-4 presente em linfócitos TCD4+ modulando negativamente a resposta T helper. No entanto, essa modulação pode prejudicar o desenvolvimento da imunidade contra tumores, já que não é certo em que fase da resposta imune a plasticidade de uma resposta Th1 ou Th2 é capaz de interferir na carcinogênese. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da modulação imune por Abatacept em modelo de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina-n-óxido (4NQO). O estudo contou com 60 camundongos da linhagem swiss divididos em seis grupos: um grupo controle negativo (GCN); um grupo controle Abatacept (GCABA); um grupo controle positivo (GCP) e três grupos teste, grupo 4NQO co-tratado com Abatacept nas últimas 6 semanas, grupo 4NQO co-tratado com Abatacept nas últimas 10 semanas e grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por 18 semanas. Os animais foram eutanasiados após 18 semanas e as línguas foram coletadas para processamento e confecção de lâminas histológicas para análise da presença e/ou severidade das alterações celulares e arquiteturais das lesões (displásicas e neoplásicas). Coleta de sangue e órgãos foi realizada para análise de toxicidade. Adicionalmente a análise de micronúcleo e a variação de massa corpórea foi verificada. Para todas as análises foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 5.0® sendo considerado nível de significância $p < 0,05$. A exposição ao 4NQO promoveu displasias de alto grau e nos animais submetidos ao carcinógeno associado ao ABA por maiores períodos revelou o desenvolvimento de carcinoma microinvasor ($p < 0,001$). A análise hematológica revelou leucocitose significativa nos grupos co-tratados com ABA por 10 e 18 semanas ($p < 0,001$). Em referência a toxicidade sistêmica, a não exposição ao carcinógeno levou ao ganho significativo de massa corpórea ($p < 0,001$) em relação aos demais. Alterações microscópicas no esôfago [grupos 4NQO e co-tratamento com ABA ($p < 0,001$)] e no intestino [grupo 4NQO co-tratados com ABA ($p = 0,009$)] foram observadas. Necrose focal no fígado dos animais do grupo 4NQO co-tratado com ABA foi significativamente menor quando comparado ao GCP ($p < 0,001$). Incremento do número de megacariócitos foi maior no co-tratamento (4NQO/ABA) por dez semanas ($p < 0,001$). Já, as alterações renais apresentaram aumento de ocorrência no grupo 4NQO ($p < 0,001$). Em relação a genotoxicidade, foi observado que o 4NQO e ABA associados provocou aumento de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados ($p < 0,001$). Conclui-se que o modelo de carcinogênese oral, induzido por 4NQO, é capaz de produzir displasias e carcinomas, além de provocar leve toxicidade sistêmica no esôfago, em órgãos viscerais e danos genéticos. O co-tratamento com CTLA-4-Ig acelerou o processo de carcinogênese de forma tempo-dependente, além de potencializar a desregulação hematológica e o dano cromossômico estrutural induzido pelo 4NQO.

Palavras-Chave (DeCS): Abatacepte; Linfócitos T; Carcinogênese; Carcinoma de Células Escamosas; 4-Nitroquinolina-1-Óxido.

ABSTRACT

Abatacept (ABA) is a drug that consists of a soluble protein resulting from the fusion of the constant fragment of human IgG1 and a CTLA-4 molecule present in TCD4+ lymphocytes negatively modulating the T helper response. However, this modulation can impair the development of immunity against tumors, since it is not certain at what stage of the immune response the plasticity of a Th1 or Th2 response is capable of interfering in carcinogenesis. The objective of this work was to evaluate the effect of immune modulation by Abatacept in an oral carcinogenesis model induced by 4-nitroquinoline-n-oxide (4NQO). The study included 60 Swiss mice divided into six groups: a negative control group (GCN); an Abatacept control group (GCABA); a positive control group (GCP) and three test groups, group 4NQO co-treated with Abatacept in the last 6 weeks, group 4NQO co-treated with Abatacept in the last 10 weeks and group 4NQO co-treated with Abatacept for 18 weeks. The animals were euthanized after 18 weeks and the tongues were collected for processing and making histological slides to analyze the presence and / or severity of cellular and architectural changes in the lesions (dysplastic and neoplastic). Blood and organs were collected for toxicity analysis. In addition, the micronucleus analysis and the variation in body mass was verified. For all analyzes, the statistical software GraphPad Prism 5.0® was used, with a significance level of $p < 0.05$. Exposure to 4NQO promoted high-grade dysplasias and in animals submitted to ABA-associated carcinogen for longer periods revealed the development of microinvasive carcinoma ($p < 0.001$). Haematological analysis revealed significant leukocytosis in the groups co-treated with ABA for 10 and 18 weeks ($p < 0.001$). In reference to systemic toxicity, the non-exposure to the carcinogen led to a significant gain in body mass ($p < 0.001$) in relation to the others. Microscopic changes in the esophagus [groups 4NQO and co-treatment with ABA ($p < 0.001$)] and in the intestine [group 4NQO co-treated with ABA ($p = 0.009$)] were observed. Focal necrosis in the liver of animals in the 4NQO group co-treated with ABA was significantly less when compared to GCP ($p < 0.001$). The increase in the number of megakaryocytes was greater in the co-treatment (4NQO / ABA) for ten weeks ($p < 0.001$). Renal changes, on the other hand, increased in the 4NQO group ($p < 0.001$). Regarding genotoxicity, it was observed that the associated 4NQO and ABA caused an increase in Micronucleated Polychromatic Erythrocytes ($p < 0.001$). It is concluded that the oral carcinogenesis model, induced by 4NQO, is capable of producing dysplasias and carcinomas, in addition to causing mild systemic toxicity in the esophagus, visceral organs and genetic damage. Co-treatment with CTLA-4-Ig accelerated the process of carcinogenesis in a time-dependent manner, in addition to potentiating hematological dysregulation and structural chromosomal damage induced by 4NQO.

Key words (MeSH): Abatacept; T lymphocytes; Carcinogenesis; Squamous Cell Carcinoma; 4-Nitroquinoline-1-oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de bloqueio da coestimulação terapêutica.....	23
Figura 2	Imagem ilustrativa da forma molecular do Abatacept, que consiste na união do domínio extracelular CTLA-4 com fragmento modificado Fc do IgG1 humana.....	23
Figura 3	Soma de mudanças cito-arquiteturais pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	38
Figura 4	Total de escores dos parâmetros analisados através da classificação de Anneroth no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	40
Figura 5	Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos..	41
Figura 6	Perfil do total de leucócitos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.....	42
Figura 7	Perfil de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.....	43
Figura 8	Perfil de basófilos e eosinófilos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.....	44
Figura 9	Análise da massa corpórea em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos.....	44
Figura 10	Fotomicrografias do esôfago de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	47
Figura 11	Fotomicrografias do estômago e intestino delgado de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	47

Figura 12	Fotomicrografias do fígado e rim de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	51
Figura 13	Fotomicrografias do baço de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	51
Figura 14	Perfil de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados e razão de Eritrócitos Policromáticos e Normocromáticos em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por	diferentes 52
Figura 15	Fotomicrografias de Eritrócitos Policromáticos e Eritrócitos Normocromáticos em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por	diferentes 53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Os critérios de arquitetura e citologia usados para classificação da displasia epitelial, conforme a classificação da OMS 2005.....	31
Quadro 2	Tipificação das alterações microscópicas do carcinoma de células escamosas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação microscópica do perfil de displasia pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	37
Tabela 2	Avaliação microscópica através da classificação de Anneroth do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	39
Tabela 3	Desfecho microscópico dos achados do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	41
Tabela 4	Avaliação microscópica do esôfago, estômago e intestino delgado de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	46
Tabela 5	Avaliação microscópica do fígado, baço e rim de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4 – NQO	4 – Nitroquinolina – N - Óxido
4- HAQO	4- hidroxiaminoquinolina 1-óxido
ABA	Abatacept
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AR	Artrite Reumatóide
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
CTLA-4	Proteína T-Linfócito-Associada citotóxico 4
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DMARD	Drogas Antirreumáticas Modificadoras de Doença
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etileno-Diamino Tetracético
EPM	Erro Padrão da Média
Fc	Fragmento Constante
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FGFR-2	Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
FGFR-3	Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
Foxp3	Forkhead Box P3
GCABA	Grupo Controle Abatacept
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G1
IL – 1	Interleucina – 1
IL – 1 β	Interleucina – 1beta
IL – 10	Interleucina – 10
IL – 13	Interleucina – 13
IL – 2	Interleucina – 2
IL – 22	Interleucina – 22
IL – 26	Interleucina – 26
IL – 4	Interleucina – 4
IL – 6	Interleucina – 6
INF – γ	Interferon – gama
IV	Intravenosa
LTs	Linfócitos T
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
MMP-2	Matriz Metaloproteinase-2
MT	Microambiente Tumoral
NCE	Eritrócitos Normocromáticos
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	Eritrócitos Policromáticos
pH	potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
SC	Subcutânea
TCR	Receptor de Célula T
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
Th	Linfócito T helper
TNF – α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
Treg	T reguladores
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
M	Mol
mg	Miligrama
mg/kg	Miligramas por Quilograma
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1 Modelos de indução e progressão de câncer	21
1.2 Linfócitos T.....	21
1.3 Abatacept.....	25
3 JUSTIFICATIVA	27
4 HIPÓTESES	28
4.1 Hipótese Nula	28
4.2 Hipótese Alternativa.....	28
5 OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo geral.....	29
5.2 Objetivos específicos	29
6 METODOLOGIA	30
6.1 Animais, princípios éticos e cálculo amostral.....	30
6.2 Grupos de estudo.....	30
6.3 Protocolo de carcinogênese oral e de administração do Abatacept	31
6.4 Análise clínica e microscópica do tumor.....	32
6.5 Análise hematológica.....	33
6.6 Variação de massa corpórea, pesagem dos órgãos e análise de toxicidade.....	34
6.7 Ensaio de micronúcleos	36
6.8 Análise estatística	36
7 RESULTADOS.....	38
8 DISCUSSÃO.....	56
9 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma neoplasia maligna caracterizada pelo crescimento incontrolado e disseminação de células anormais. A falta de tratamento pode resultar em óbito do indivíduo portador da doença. Essa neoplasia maligna é causada por fatores extrínsecos, como tabaco, produtos químicos, radiação, e organismos infecciosos; e fatores intrínsecos, como mutações genéticas, hormônios, condições imunes e mutações que ocorrem do metabolismo. Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover carcinogênese. Certos tipos de câncer podem ser prevenidos pela eliminação da exposição aos fatores que aceleram este processo. Essa neoplasia pode ser tratada por cirurgia, radiação, quimioterapia e imunoterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Carcinogênese é o processo de desenvolvimento de uma neoplasia maligna, estudos têm mostrado que ocorre em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Durante esses estágios, há um acúmulo de mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, principalmente, em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, nos que revertem eventuais erros na replicação do material genético ou nos que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (BELIZÁRIO, 2002).

A grande prevalência do câncer bucal está relacionada à ação de agentes físicos e químicos com potencial mutagênico. Desta maneira, com o desenvolvimento industrial, diversas substâncias químicas passaram a exercer um papel importante no desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias em humanos (MENDONÇA, 1992; SALTZ, 1998). Aproximadamente, 80% das neoplasias estão relacionadas, direta ou indiretamente, a agentes extrínsecos ou ambientais que envolvem hábitos alimentares, hábitos sociais e exposição a poluentes (HIGGINSON, 1993; BOFFETTA *et al.*, 2003). Diversos fatores como vírus oncogênicos, imunodeficiência, dietas pobres em frutas, verduras e legumes e higiene bucal inadequada podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença (SCULLY, PORTER, 2000).

Durante o processo de progressão tumoral, os mecanismos que regulam a replicação celular são ultrapassados, estabelecendo-se, assim, o fenótipo maligno. Os oncogenes são encontrados em todas as células do corpo, sendo designados de proto-oncogenes, que realizam funções de homeostasia celular. Quando mutados, os oncogenes acabam superexpressos e produzindo células neoplásicas. Já os genes de supressão

tumoral, como o gene “p 53” é essencial na regulação da progressão, diferenciação, reparo do DNA e apoptose do ciclo celular. Esses genes inibem a proliferação celular, servindo como importante fator etiológico. Uma mutação no gene p53 é expresso em 50% dos pacientes com câncer de boca (BRASIL, 2002; SINEVICI, O’SULLIVAN, 2016).

Nessa perspectiva, diversos estudos experimentais buscam compreender os mecanismos envolvidos na progressão tumoral. Em uma tentativa de desenvolver carcinogênese oral em animais, diversos carcinógenos foram avaliados, alcatrão de carvão, fumaça de cigarro e 20-metil colantreno (20MC). Entretanto, aplicação desses produtos químicos não foram capazes de induzir tumores. Logo, o uso do 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) foi extensivamente utilizado em modelos de carcinogênese, contudo ocasionava resposta inflamatória intensa, necrose e descamação, prejudicando de forma potencial o estudo das lesões iniciais durante a carcinogênese. (KANOJIA *et al.*, 2006).

Diferentemente o 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO) tem sido amplamente utilizado para a indução de câncer, incluindo dorso de língua, palato e esôfago. Uma vez que esse carcinógeno forma adutos de DNA, levando a substituição de adenosina por guanosina, induzindo ao estresse oxidativo intracelular. Os efeitos resultantes da aplicação do 4NQO é extremamente semelhante as alterações induzidas pelo tabaco. Por esse motivo, foi considerado um carcinógeno capaz de ocasionar a carcinogênese oral em modelos murinos (KANOJIA *et al.*, 2006; MIKI *et al.*, 2016).

Portanto, resposta imune contra tumores é mediada por milhares de células imunes. Os linfócitos TCD8+ e TCD4+ permanecem mediadores essenciais e potentes da imunidade antitumoral, e a infiltração tumoral por células T é um bom marcador de prognóstico. As células efetoras são capazes de cruzar a barreira endotelial e atingir o estroma tumoral até alcançarem os alvos das células tumorais. Ao encontrarem seus alvos, diversos sinais imunossupressores podem contribuir com a supressão imunológica, como linfócitos imunossupressores e células supressoras derivadas de mieloides que impedem ação efetoras dos TCD8+. Os linfócitos reguladores (Tregs) são ativamente recrutadas por tumores, e seu acúmulo foi associado a um mau prognóstico em alguns estudos (MOTZ, G. T.; COUKOS, G. 2013).

As células Treg têm uma ação oposta às células T CD8 citotóxicas, e a redução do número dessa população de linfócitos foi relacionada ao aumento da imunidade antitumoral e consequente regressão do tumor em diferentes tipos de câncer (O’HIGGINS; WARD e ABU EID, R, 2018). Além disso, o próprio microambiente

tumoral promove a expansão de linfócitos T reguladores, através da liberação de IL-10, TGF- β e adenosina que derivam de células tumorais ou células dendríticas residentes no tumor (MOTZ, G. T.; COUKOS, G. 2013).

A proteína T-linfócito-associada citotóxica 4 CTLA-4 atua impedindo a ativação de Linfócitos TCD4⁺ via CD28/CD80/86. Nessa perspectiva, o fármaco Abatacept foi desenvolvido para o tratamento de doenças autoimunes, portanto, age mimetizando a ação da molécula CTLA-4. A modificação da competência imunológica pode provocar um declínio da vigilância do hospedeiro contra tumores. (WADSTRÖM *et al.*, 2017).

Por essa razão, estudos precisam ser executados a fim de compreender as diversas vias existentes no microambiente tumoral, e a ocorrência de neoplasias malignas em pacientes tratados com imunomoduladores precisa ser avaliada com cautela (XU *et al.*, 2020).

2 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Modelos de indução e progressão de câncer

Estudos têm procurado compreender o processo de indução e progressão do câncer de boca em modelos animais. Existem diversos modelos experimentais de carcinogênese e o modelo químico de indução parece ser o mais próximo da realidade clínica, sendo o da aplicação de 4-nitroquinolinal-óxido (4NQO) o mais utilizado. Os modelos de carcinogênese por administração do 4NQO demonstram uma evolução clínica e histopatológica extremamente semelhante às fases observadas nos carcinomas de células escamosas em humanos, desde a fase de carcinoma *in situ* até o estágio bem diferenciado, seguindo a gradação histopatológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o carcinoma de células escamosas (BARCESSAT *et al.*, 2014).

O modelo de indução com o 4NQO costuma ser realizado com a administração da solução diluída em água ou por meio da fricção da solução no ventre da língua. Acredita-se que a administração por meio da fricção possa causar menos efeitos sistêmicos tóxicos indesejados em outras regiões do organismo, visto que a quantidade ingerida se torna menor, embora alterações hepáticas, renais e esplênicas já tenham sido detectadas (BARCESSAT *et al.*, 2014).

O 4-nitroquinolina (4NQO) é uma quinolina que possui uma estrutura aromática heterocíclica de fórmula C_9H_7N que pode ser encontrada naturalmente no ambiente, mas é tipicamente fabricado para fins de pesquisa. O 4NQO imita os carcinógenos oriundos do fumo de cigarro em vários organismos tanto diretamente, mas, principalmente, após sua degradação no metabólito reduzido 4-hidroxi-aminoquinolina 1-óxido (4HAQO). Esse metabólito se liga covalentemente a macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, causando dano ao material genético, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (KANOJIA *et al.*, 2006).

1.2 Linfócitos T

As células precursoras de células T são originadas na medula óssea em que percorrem até o timo, local onde sofrem modificações sequenciais intensas, caracterizando os diferentes estágios de diferenciação dos linfócitos T (LT). Durante a fase de LT imaturo, 95% dos linfócitos são formados por cadeias α e β e darão origem aos correceptores CD4 e CD8, e os demais, são compostos por cadeias γ e δ , cujo processo de ativação não foi ainda completamente esclarecido (STUTMAN, 1978; SOUZA, 2010).

Linfócitos auxiliares, conhecidos como CD4+, LT naive, são ativados principalmente em órgãos linfóides periféricos (secundários), nos quais essas células normalmente circulam e encontram os antígenos apresentados por células dendríticas maduras. Esses linfócitos circulam por todo o corpo em estado de repouso e somente adquirem especificidades funcionais após sua ativação. Essa ativação ocorre em órgãos linfóides especializados, linfonodos, baço e tecidos linfóides de mucosa, onde os linfócitos naive e as células apresentadoras de antígenos (APCs) se encontram. Nesse momento, podem se diferenciar em diversos subtipos (ROBBINS *et al.*, 2016; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019).

Entretanto, microambiente tumoral é altamente complexo e vai muito além da participação de linfócitos. Portanto, diversas células participam desse microambiente. As células dendríticas (DCs) são essenciais para a organização da resposta imune antitumoral, uma vez que, são capazes de apresentar antígenos tumorais as células efectoras, para iniciar uma resposta eficaz e específica. No entanto, DCs imaturas ou incompletamente maturadas podem exercer um papel contrário ao esperado e assim conduzir a tolerância ao tumor, induzindo anergia de células T efectoras e / ou expansão de células Treg no microambiente tumoral (MOTZ, G. T.; COUKOS, G. 2013).

Por sua vez, as células T reguladoras podem ser categorizadas em Tregs naturais, proveniente do timo e mantidas por meio do TGF β e em Tregs induzíveis originadas a partir de precursores de células TCD4+. A produção de mediadores como TGF β , IL-10 e IL-35 por meio de linfócitos Tregs estão envolvidos na supressão de células T efectoras e citocinas como INF γ . Além disso, a inibição de linfócitos efetores pode ocorrer por meio da liberação de adenosina via Tregs, bem como por meio de citólise mediada por TRAIL (MOTZ, G. T.; COUKOS, G. 2013). Portanto, as células Tregs suprimem o sistema imune tanto sistemicamente, quanto em um microambiente tumoral (MIKI *et al.*, 2016). Previamente, foi demonstrado em um estudo experimental que a depleção de células Tregs no microambiente tumoral resulta em uma melhora significativa da resposta da imunológica contra o tumor, ratificando, assim, estudos clínicos que mostraram que o aumento de células TCD4+ intratumorais em pacientes com carcinomas de células escamosas orais revelaram um pior prognóstico, especialmente quando há uma alta densidade de Foxp3+ (ZHOU, *et al.* 2013).

As células CD4 + desempenham diversas funções biológicas de acordo com suas subpopulações. Th1 auxilia na função citotóxica das células CD8 +, enquanto Th2, Th17 e células T reguladoras (Tregs) podem manipular negativamente a imunidade adaptativa.

Entretanto, o principal mecanismo de defesa antitumoral é a morte de células tumorais causadas por linfócitos T CD8 +, também conhecidos como linfócitos T citotóxicos. Estudos prévios revelam que a expressão de CD8 mais alta foi vista em pacientes sem metástase nodal e ainda foi correlacionada com prognóstico favorável, independente dos estágios (FANG, *et al.* 2017).

Contudo, em um microambiente de lesões potencialmente malignas, foi observado infiltração significativa de células TCD8+ e células NK, associado a altos níveis de Th1, Tc1 e Th17 quando comparado a amostras de carcinomas de células escamosas. Entretanto, também mostram expressão elevada de componentes de MMP-2, FGF-2 e seus receptores FGFR-2 e FGFR-3, que são preditivos de progressão para Carcinoma de Células Escamosas Oral. (PELTANOVA, RAUDENSKA, MASARIK, 2019). Nessa perspectiva, mecanismos de supressão desses de linfócitos TCD8+ podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumoral, visto que os linfócitos efetores são capazes de induzir à morte celular, a via Fas-FasL (SILVA, *et al.* 2013).

Além disso, as células tumorais ainda possuem diversos mecanismos de escape, impedindo a ação antitumoral do sistema imune. Uma dessas vias é a mutação no gene MHC I, levando, assim, a uma perda do reconhecimento do tumor pela célula T. Por essa razão, a indução de respostas de células T específicas para o tumor com frequência requer apresentação cruzada por meio das células dendríticas que expressam coestimuladores e moléculas classe II. Dessa forma, as células T são ativadas. Porém, o principal mecanismo do Abatacept é mimetizar a ação da molécula CTLA-4 que compete pelo mesmo ligante do CD28 e, conseqüentemente, desliga a ativação dos linfócitos e, em conseqüência, não há recrutamento de linfócitos CD8 nem a destruição da célula tumoral (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019).

Após ocorrer as ligações primárias e secundárias entre APCs e LTs naive, acontece a diferenciação dos linfócitos auxiliares. As ligações primárias são realizadas entre o MHC, na superfície das APCs e TCR presente nos LTs. Diferentemente da ligação secundária em que células T expressam em sua superfície a proteína CD28 que interage com seus ligantes B7, também conhecidos como CD80 e CD86 que pertencem às células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas. Assim, o que determina a especificidade de cada célula são as citocinas liberadas no momento das ligações. (LIBBY, LICHTMAN, 2019; LINSLEY *et al.*, 1991; GEMMELL *et al.*, 2001; PAWLAK, *et al.*, 2005; MESQUITA JÚNIOR, 2010).

A interação do ligante (CD 80/CD 86) ao CTLA-4 gera sinais inibitórios

intrínsecos que “desligam” a ativação, proliferação e produção de IL-2 relacionada com proliferação de linfócitos T (FIGURA 1).

O domínio extracelular de CTLA-4 para bloquear as moléculas B7 possui maior afinidade por B7 quando comparado ao CD28. Porém, é expresso apenas após ativação dos LTs, diferentemente do CD28, expresso em LT ainda em repouso. (LINSLEY *et al.*, 1991; FREEMAN *et al.*, 1992; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013; GARDNER, JEFFERY, SANSOM, 2014; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019).

As doenças autoimunes foram relacionadas à ativação e à ação dos linfócitos T. Por esse motivo, o bloqueio simultâneo de ambos dos ligantes foi amplamente explorado no contexto da proteína de fusão CTLA-4-Ig e passou a ser estudada como uma nova opção de tratamento para doenças autoimunes. Ao explorar a maior afinidade do CTLA-4 por seus ligantes, esses compostos mostraram inibir as respostas de células T em modelos de doença autoimune e em modelos de transplante e, a partir desses estudos, foi desenvolvido o Abatacept. (KLIWINSKI *et al.*, 2005; ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN, ALCOCER-VARELA, 2013; GARDNER, JEFFERY, SANSOM, 2014).

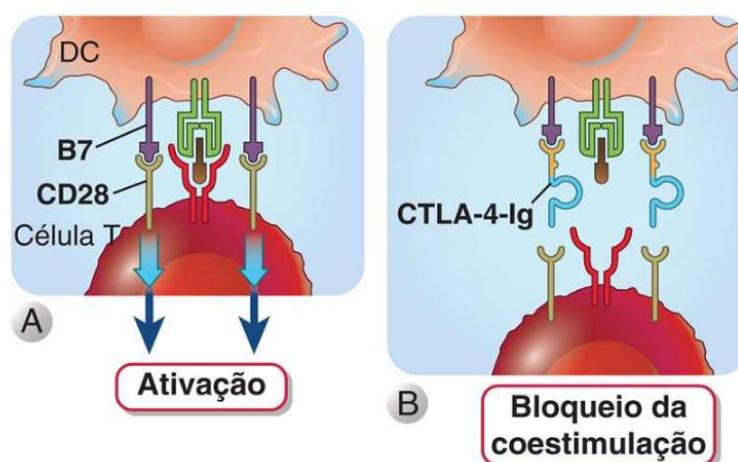


Figura 1: Mecanismo de bloqueio da coestimulação terapêutica. A) Resposta normal de células T induzida pelo reconhecimento do antígeno mediada por B7-CD28. B) Uma proteína de fusão que consiste na porção extracelular de CTLA-4 e na cauda Fc de uma molécula de IgG é utilizada para se ligar e bloquear as moléculas B7, prevenindo, assim, sua interação com o receptor de ativação CD28 e inibindo a ativação das células T." Fonte: (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019)

1.3 Abatacept

CTLA-4 Ig (Abatacept) é utilizado com sucesso no tratamento de doenças auto-imunes e aprovado para o tratamento da artrite reumatoide (AR). O Abatacept (ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) é um inibidor da ativação de linfócitos TCD4+, pois consiste em uma proteína de fusão recombinante de CTLA-4 com a porção Fc da IgG1 humana composta. (FIGURA 2) (ÖSTÖR, 2008; LORENZETTI, *et al.*, 2019).

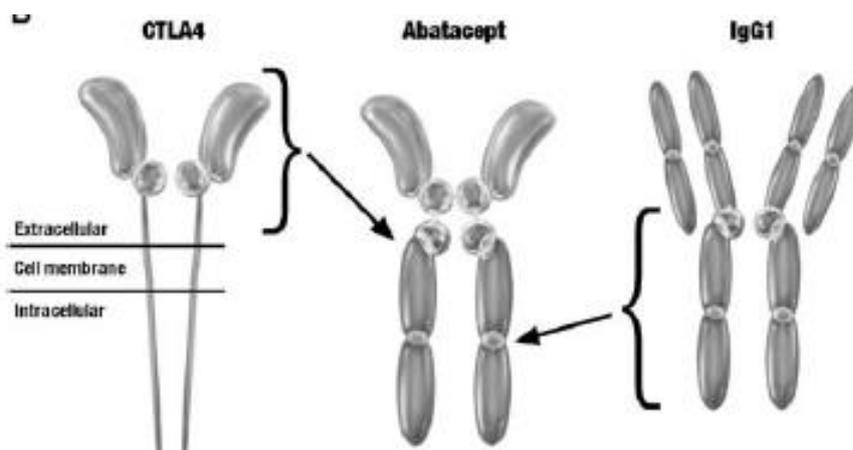


Figura 2: Imagem ilustrativa da forma molecular do Abatacept, que consiste na união do domínio extracelular CTLA-4 com fragmento modificado Fc do IgG1 humana.

Fonte: adaptada de ÖSTÖR, 2008.

Apresenta-se como o único agente biológico que pode ser administrado por meio de via intravenosa (IV) ou subcutânea (SC), sendo ambas igualmente eficazes. A dose IV varia de 500 – 1000 mg, a depender do peso do paciente, e deverá ser administrada em doses de 250 mg por dia até que a prescrição recomendada seja atingida. Esse protocolo deverá ser repetido mensalmente. A dose SC, por sua vez, é de 250 mg e deverá ser administrada semanalmente. As administrações podem ainda ser realizadas com dose de ataque IV e seguido de doses de manutenção por via SC (IWAHASHI *et al.*, 2015).

Agentes biológicos, incluindo inibidores do fator de necrose tumoral (TNFi) e não TNFi, como Abatacept, são cada vez mais usados como tratamentos eficazes para doenças inflamatórias imunomediadas, como artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (IBA *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação desse fármaco consiste na inibição da via CD28:CD80/86, no qual o Abatacept se liga tanto ao CD86 como ao CD80. Esse medicamento possui as mesmas afinidades naturais de ligação ao ligante que o CTLA - 4 e, como tal, tem uma

forte preferência pela ocupação do CD80. Isso denota em ocupação incompleta do CD86 com ligação mais completa ao CD80. Tal fato diminui, mas não elimina totalmente a sinalização de CD28 e pode deixar CD86 suficiente disponível para promover a sobrevivência das células T reguladoras (Treg). (GARDNER, JEFFERY, SANSOM, 2014). Portanto, age como um regulador negativo da ativação dos LT, ocasionando menor produção de células T e B, conseqüentemente, influencia na diferenciação dos linfócitos Thelper (ÖSTÖR, 2008).

O Abatacept ataca diretamente as células B, reduzindo a expressão de CD80 / CD86 (LORENZETTI *et al.*, 2019). Assim, a ação do fármaco resulta na diminuição de linfócitos T e B, interferindo primeiramente na imunidade humoral. (OTANI, KUROSAKA, 2019). Entretanto, esses achados se referem a pacientes com AR e pouco se sabe acerca da influência desse medicamento na expressão de células Th1, Th2 e Th17 em um microambiente tumoral, especialmente sua atividade nas diversas fases da carcinogênese.

Em um estudo de coorte se observou a incidência de câncer em pacientes usuários de Abatacept versus outras medicações imunossupressoras e foi visto que o risco de Abatacept aumenta em 1.2 vezes o risco de desenvolvimento de câncer de pele não melanoma (MONTASTRUC *et al.*, 2019).

A modulação imunológica pode contribuir de diferentes formas no desenvolvimento e na progressão dos tumores de cabeça e pescoço, já que Th1 exibe potente efeito antitumoral. Por outro lado, as células Th2 secretam citocinas que medeiam a resposta humoral anti-inflamatória e a imunossupressão via inibição da produção de citocinas Th1. (XU *et al.*, 2016). Portanto, é objetivo do presente estudo avaliar o efeito da modulação imune por Abatacept em modelo animal de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO) na iniciação, promoção e progressão tumoral.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer é um problema de saúde pública mundial que a cada ano há um incremento de casos em todas as regiões do mundo. Para o Brasil, estimam-se 11.200 casos novos de câncer de boca em homens e 4.010 em mulheres para cada ano do biênio 2020-2021. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição e de 3,71 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os cânceres (BRASIL, 2020).

O risco aumentado para o desenvolvimento de câncer tem sido associado ao uso de drogas antirreumáticas modificadoras de doenças (DMARDs) especialmente o Abatacept (ABA), que é amplamente utilizado o tratamento da Artrite Reumatoide. Esse fármaco é capaz de induzir a incompetência imunológica parcialmente, dado que mimetiza a ação da molécula CTLA-4, capaz de bloquear ativação de células T efectoras. (MONTASTRUC *et al.*, 2019). Um estudo de coorte prospectivo demonstrou que o Abatacept apontou um risco elevado em relação aos demais medicamentos antirreumáticos para o desenvolvimento de câncer de pele de células escamosas invasivo. (WADSTRÖM *et al.*, 2017)

No entanto, há poucos relatos na literatura científica acerca da influência de imunomoduladores no câncer de boca, revelando a necessidade de estudos que investiguem a diferenciação de linfócitos T e, conseqüentemente, possibilitar indícios de melhores tratamentos para o carcinoma de células escamosas oral. Em vista disso, propõe-se com esse trabalho, investigar o efeito do Abatacept, um inibidor da ativação de linfócitos TCD4⁺ que mimetiza a ação da molécula CTLA-4 no modelo de câncer de boca, induzido pelo 4NQO. Dessa forma, supõe-se que a manipulação do sistema imune possa resultar em efeitos antineoplásicos ou imunossupressores, a depender da via de diferenciação dos linfócitos.

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese Nula

O tratamento com Abatacept não influencia na iniciação, promoção ou progressão da carcinogênese.

4.2 Hipótese Alternativa

O tratamento com Abatacept influencia na iniciação, promoção ou progressão da carcinogênese.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com Abatacept em modelo animal de carcinogênese oral induzida por 4NQO.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações clínicas e microscópicas do dorso lingual de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO e de camundongos tratados com Abatacept durante iniciação, promoção tumoral e após estabelecimento do tumor;
- Avaliar a influência do tratamento com Abatacept em alterações hematológicas e de variação de massa corpórea de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO;
- Avaliar a toxicidade no trato gastrintestinal e órgãos viscerais de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO e tratados com Abatacept;
- Avaliar a instabilidade genética em medula óssea de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO e tratados com Abatacept.

6 METODOLOGIA

6.1 Animais, princípios éticos e cálculo amostral

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará protocolado sob o CEUA nº 7146180618, estando de acordo com a Lei Federal nº 11.794 (2008) e a Diretriz Brasileira para o cuidado e utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (DBCA 2016) que regulamentam a experimentação animal no país.

Fundamentado no princípio dos 3R (*reduction, replacement and refinement*) que norteiam as condutas éticas em animais e baseado no modelo de carcinogênese orofaríngea com 4NQO de TANG *et al.* que em 2004, observou que animais tratados com solução 100µg/ml apresentaram maior frequência de tumores que animais tratados com uma subdose de 20µg/ml (100% versus 33%), estimam-se necessários 10 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente 80% de poder e 95% de confiança no presente modelo (Método de Fleiss com correção de continuidade). (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSCC.htm>).

Um total de 60 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos com seis a oito semanas foram acondicionados no biotério de experimentação do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará em temperatura média de 24° C com ciclos de 12 horas de luz-escuro e acesso irrestrito a água e a alimento. Os animais foram aleatorizados (comando aleatório, Microsoft Excel) em seis grupos de estudo conforme protocolo abaixo citado.

6.2 Grupos de estudo

Seis grupos de estudo, cada um com 10 camundongos, foram distribuídos aleatoriamente em:

Grupo Controle Negativo (GCN): O grupo foi submetido ao modelo de carcinogênese oral utilizando apenas o veículo do 4NQO;

Grupo Controle Abatacept (GCABA): O grupo foi submetido ao tratamento com Abatacept durante todo o protocolo experimental;

Grupo Controle Positivo (GCP): O grupo foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO a 4%);

Grupo 4NQO + Abatacept 6 semanas: O grupo foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO 4%, tendo início do tratamento com Abatacept nas últimas 6 semanas do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência após estabelecimento das lesões;

Grupo 4NQO +Abatacept 10 semanas: O grupo foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO 4%, tendo início do tratamento com Abatacept nas últimas 10 semanas do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência na progressão das lesões;

Grupo 4NQO +Abatacept 18 semanas: O grupo foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO 4%, tendo início do tratamento com Abatacept desde o início do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência na iniciação das lesões.

6.3 Protocolo de carcinogênese oral e de administração do Abatacept

Uma solução 1% de 4NQO (GANNOT *et al.*, 2004) dissolvida em propilenoglicol e DMSO a 4% (KAPLAN *et al.*, 2002) foi aplicada topicamente no dorso lingual.

A aplicação ocorreu cinco vezes por semana (segunda a sexta) durante 18 semanas conforme protocolos previamente descritos (BARCESSAT *et al.*, 2014). Os camundongos foram imobilizados a fim de obter a cavidade bucal aberta, e assim realizar a administração do 4NQO por meio de microbrushes que foram pincelados levemente durante 10 segundos.

O Abatacept foi administrado na posologia de 16mg/Kg por via subcutânea fracionada em três administrações semanais do início do protocolo de cada grupo experimental (GCABA, ABA 6, ABA 10 e ABA 18) até o dia da eutanásia (LON *et al.*, 2013). Após 18 semanas, os camundongos foram anestesiados com xilazina e quetamina 10mg e 90mg respectivamente, coletado o sangue via plexo retro orbital e, posteriormente eutanasiados por complementação anestésica com 3 vezes a dose usual para remoção dos tecidos orais e órgãos.

6.4 Análise clínica e microscópica do tumor

Visualização direta da língua foi realizada a fim de verificar possíveis alterações teciduais, como áreas avermelhadas, placa ou elevações induzidas pelo 4NQO. Posteriormente, as línguas e tecidos adjacentes foram excisados e fixados em formol 10% tamponado para avaliação macroscópica. As línguas foram hemisseccionadas longitudinalmente, os fragmentos acomodados em cassetes histológicos para processamento através da desidratação (solução crescente de álcool) e diafanização (xilol) em processador automático (Luptec®). Posteriormente, os fragmentos foram emblocados em parafina fundida a 58-60°C. Após isso, os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 3µm, dispostos em lâminas de vidro com ponta fosca, as quais foram desparafinizadas em estufa (60°C) por uma hora, imersas em banhos de xilol, reidratadas (solução alcoólica decrescente), coradas com hematoxilina-eosina, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellan®.

A partir daí, todas as lesões foram submetidas a diferentes métodos de avaliação histológica com o intuito de obter uma maior sensibilidade na avaliação. Posteriormente, foi realizado um desfecho microscópico dos achados do epitélio de dorso de língua. A análise das lesões foi realizada através da classificação da Organização Mundial da Saúde, 2005, que verifica a presença de mudanças arquiteturais e citológicas no epitélio do dorso de língua. (Quadro 1). Além disso, foi também adotado o sistema binário de classificação (KUJAN *et al.*, 2006) em alto risco quando ocorreram 4 ou mais alterações arquiteturais e 5 ou mais alterações citológicas e baixo risco quando ocorreram menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações. Logo após, foi realizado o somatório das alterações histopatológicas, através da média encontrada dentro de cada grupo experimental.

Quadro 1: Os critérios de arquitetura e citologia usados para classificação da displasia epitelial, conforme a classificação da OMS 2005.

Alterações Arquiteturais	Alterações Celulares
Estratificação Epitelial Irregular	Anisonucleose de variação anormal
Perda de Polaridade das Células Basais	Pleomorfismo Nuclear
Cristas em forma de gota	Variação anormal na anisocitose

Aumento do número de figuras mitóticas	Razão citoplasmática nuclear aumentada
Figuras mitóticas anormalmente superficiais	Aumento do tamanho nuclear
Disceratose	Figuras mitóticas atípicas
Pérolas de Queratina	Aumento no número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromasia

Fonte: KUJAN *et al.*, (2006)

Adicionalmente, todos os tecidos das línguas foram avaliados através da classificação adaptada por Anneroth; Hansen; Silverman, (1986) com intuito de mensurar a intensidade dos achados histopatológicos nos grupos:

Quadro 2: Tipificação das alterações microscópicas das lesões em dorso de língua.

Alteração microscópica	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Queratinização	Ausência de alteração	> 50%	20 e 50%	<20% + Disceratose
Pleomorfismo nuclear	Ausência de alteração	=25%	50%	>50%
Estágio de invasão	Ausência de alteração	Invasão questionável da lâmina própria	Micro invasão da lâmina própria	Invasão extensiva de tecidos adjacentes
Infiltrado inflamatório histio- linfoplasmocitário	Ausência de alteração	Leve	Moderada	Intenso

Fonte: Adaptado de ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN, (1986)

6.5 Análise hematológica

Após anestesia com xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), foi coletado 2mL de sangue pelo plexo retro-orbital para análise hematológica e imediatamente armazenado em eppendorfs, contendo 0,2mL de solução 1% de ácido etileno-dimamino tetra-acético (EDTA) dissolvido em solução salina estéril 0,9%. Posteriormente,

sobredose de xilazina (30mg/kg) e quetamina (240mg/kg) foi adicionalmente administrada para eutanásia. Uma gota de sangue foi disposta sobre uma lâmina de vidro para coloração por panótico rápido e análise hematológica.

A leitura se deu em movimento de zigue-zague transversal ao tamanho da lâmina em direção da parte mais espessa para a parte menos espessa. Foram contados os números de cada um dos elementos sanguíneos celulares (neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos) até um total de 100 células contadas, obtendo-se, assim, a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. Para contagem total de leucócitos foi manipulado individualmente de cada animal, 20µl de sangue juntamente com 380µl da solução de Turk, colocados em eppendorfs e submetidos ao vórtex. Posteriormente, o resultante foi colocado em uma câmara de Neubauer e contabilizado os leucócitos totais presentes nos quadrantes das extremidades da câmara (GOES *et al.*, 2014).

6.6 Variação de massa corpórea, pesagem dos órgãos e análise de toxicidade

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da variação de massa corpórea e, após eutanásia, foram retirados o esôfago, estômago e intestino delgado, bem como fígado, baço e rins para análise de toxicidade. Os tecidos do trato gastrointestinal foram excisados, lavados com solução salina estéril, utilizando seringa hipodérmica sem agulha e fixados em formol 10% tamponado. Rins, baço e fígado também foram retirados cirurgicamente, pesados em balança de 10⁻⁵g de precisão e fixados, igualmente, em formol 10% neutro. Todas as amostras foram submetidas à análise macroscópica.

O esôfago e o intestino delgado foram seccionados transversalmente e, o estômago aberto e dividido em duas porções, fundo e cárdia. O fígado foi seguido um fragmento transversal do maior lobo hepático, contendo 3mm de espessura. Os rins e baço foram hemisseccionados longitudinalmente para inclusão. Após processamento histológico em processador automático de tecidos (Luptec®), as amostras foram embebidas em parafina, seccionadas com 3µm de espessura, e os cortes foram dispostos em lâminas convencionais para coloração por Hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017)

Para análise histopatológica em microscópio ótico, um patologista oral experiente descreveu os achados histológicos com base na presença ou ausência das alterações específicas de cada órgão, descritos a seguir (SILVA *et al.*, 2016). Somente no baço foi realizada avaliação quantitativa.

6.6.1 Esôfago

As lâminas referentes ao esôfago foram analisadas por meio de presença e/ou ausência, para cada um dos parâmetros (GREAVES, 2007): integridade do epitélio de revestimento, vasos ectásicos, foco inflamatório em submucosa, tampões de ceratina, bem como pleomorfismo basal, mitose e células apoptóticas.

6.6.2 Estômago

Para analisar a toxicidade no estômago, foram consideradas as alterações presentes na região fúndica e na cárdia.

Na região de cárdia foram analisados os seguintes parâmetros (GREAVES, 2007): integridade do epitélio escamoso de revestimento, presença de vasos ectásicos e/ou hemorragia na submucosa e mucosa, como também de células inflamatórias.

Na região de fundo foram considerados para análise: integridade do revestimento de mucosa, presença/rarefação de células parietais e principais, congestão vascular e/ou hemorragia na submucosa e mucosa, além da presença de células inflamatórias.

6.6.3 Intestino delgado

Para análise de toxicidade no intestino delgado, o achatamento dos vilos, perda das criptas, inflamação aguda e crônica na mucosa e/ou submucosa, vacuolização/edema e preservação do tecido muscular foram parâmetros considerados (GREAVES, 2007).

6.6.4 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações (adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2007; adaptado de BARBIERI *et al.*, 2010): infiltração de células inflamatórias; tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos, hiperplasia de células de Kupffer, hemorragia sinusoidal, necrose focal de hepatócitos, esteatose micro vesicular (>5%) em hepatócitos e esteatose macro vesicular (>5%).

6.6.5 Rim

Já para as lâminas referentes ao tecido renal, a tumefação do epitélio tubular, presença de células inflamatórias perivascular e intersticiais, cilindro-hialino, hemorragia glomerular e intersticial foram utilizados para a avaliação de toxicidade (adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2007; adaptado de BARBIERI *et al.*, 2010)

6.6.6 Baço

Para análise de toxicidade do baço foram analisadas de forma qualitativa a manutenção da proporcionalidade entre polpa branca e vermelha e presença de hemorragia. Já quantitativamente, 5 campos em aumento 200x, foram contados o número de megacariócitos presentes, resultando em uma média por animal (GREAVES, 2007).

6.7 Ensaio de micronúcleos

A remoção do fêmur de cada animal de todos os grupos foi realizada no dia da eutanásia, e exposto o canal medular. Logo após, com auxílio de uma agulha previamente preenchida com soro fetal bovino, foi inserida no canal da medula e o êmbolo acionado, a fim de empurrar o conteúdo para dentro de um falcon. O resultante da coleta foi imediatamente submetido à citocentrífuga 2000D Revan® a 900 RPM, por 5 minutos. As lâminas foram coradas com corante de Wright puro durante 1 minuto, lavadas com água destilada pH 7,0 e montadas com Enthellam® (LEE *et al.*, 2021).

Foram fotografados 20 microcampos de cada lâmina em aumento de 1000x usando óleo de imersão, as imagens foram realizadas em microscópio acoplado a câmera e software apropriados (Leica®). Foram contados o número de eritrócitos policromáticos (PCE), eritrócitos normocromáticos (NCE), e o número de eritrócitos policromáticos micronucleadas (MNPCEs). De modo a avaliar a toxicidade para a medula óssea, a razão de PCE para NCE também foi observada. (KRISHNA, HAYASHI, 2000; LEE *et al.*, 2021)

6.8 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos em forma de média \pm EPM, analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, comparados, utilizando o teste ANOVA-1-way e ANOVA-2-way seguido do pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos). Os escores histológicos foram expressos como mediana (máxima e mínima) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de

Dunn.

Em todas as análises estatísticas considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0.05$), e todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

7 RESULTADOS

Perfil de alterações clínicas, arquiteturais e citológicas no epitélio de dorso de língua dos camundongos submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept

Nenhuma alteração clínica, incluindo áreas avermelhadas, elevações ou placas foram observadas no epitélio de dorso de língua dos animais analisados, através da visualização direta. Portanto, todos os dorsos das línguas dos camundongos estavam íntegros, sem alterações clínicas significativas.

Alterações arquiteturais e celulares foram avaliadas, incluindo, estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, aumento do número de figuras mitóticas, bem como figuras mitóticas anormalmente superficiais. O somatório médio dessas alterações foi significativamente maior no grupo controle positivo (13.40 ± 0.16), e nos grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com Abatacept por 6 (seis) (12.56 ± 0.87), 10 (dez) (15.00 ± 0.00) e 18 (dezoito) (13.90 ± 0.99) semanas, quando comparados ao grupo controle negativo (3.33 ± 0.80) ($p < 0,001$) (Tabela 1) (Figura 3).

A formação de cristas em forma de gota mostrou aumento significativo nos grupos 4NQO e co-tratados com ABA por dez (100%) e 18 semanas (100%), em comparação ao controle negativo (0%) ($p < 0,001$). Da mesma forma, a prevalência de disceratose também foi significativamente superior nos grupos que receberam Abatacept por dez (100%) e dezoito (80%) semanas, comparados ao grupo controle negativo (0%) ($p < 0,001$) (Tabela 1). O percentual de displasias de alto risco por padrão arquitetural foi significativamente maior no grupo controle positivo (100%) e nos grupos 4NQO co-tratados com ABA por seis (100%), dez (100%) e dezoito (100%) semanas quando comparado ao grupo controle negativo (33%) ($p < 0,001$) (Tabela 1).

O grupo controle positivo (9.00 ± 0.00), assim como os grupos que foram expostos ao carcinógeno e receberam o Abatacept por seis (9.00 ± 0.00), dez (9.00 ± 0.00) e dezoito (9.00 ± 0.00) semanas, revelaram aumento significativo na quantidade de alterações celulares, em comparação com o grupo controle negativo (3.33 ± 0.33) ($p < 0,001$) (Tabela 1). A porcentagem de displasias de alto risco por padrão celular foi significativamente maior no grupo controle positivo (100%) e nos grupos co-tratados com ABA por seis (100%), dez (100%) e dezoito (100%) semanas comparado com o grupo controle negativo (0%) ($p < 0,001$) (Tabela 1).

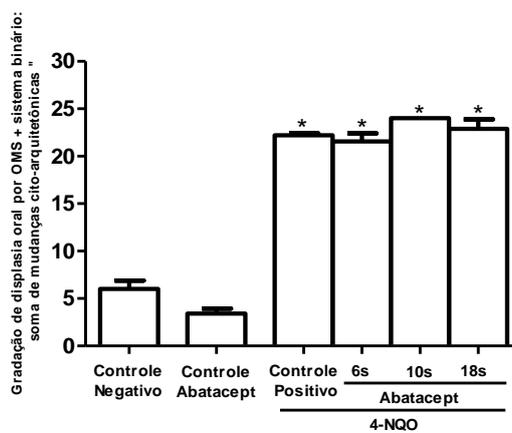
Tabela 1: Avaliação microscópica do perfil de displasia pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.

	4NQO						p-Valor
	GCN	GCABA	GCP	Abatacept			
				6 semanas	10 semanas	18 semanas	
Alterações arquiteturais							
Estratificação Epitelial							
Irregular	4 (67%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Perda de Polaridade das							
Células Basais	2 (33%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Cristas em forma de gota	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	5 (56%)	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Aumento do número de							
figuras mitóticas	0 (0%)	2 (20%)	10 (100%)*	6 (67%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Figuras mitóticas							
anormalmente superficiais	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	7 (78%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Discratose	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (56%)	9 (100%)*	8 (80%)*	<0,001 ^a
Pérolas de queratina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000a
Quantidade de alterações							
arquiteturais	3.33±0.80	1.60±0.34	13.40±0.16*	12.56±0.87*	15.00±0.00*	13.90±0.99*	<0,001 ^b
Displasias de alto risco por							
padrão arquitetural	2 (33%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Alterações celulares							
Anisonucleose de variação							
anormal	6 (100%)	6 (60%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	0,002 ^a
Pleomorfismo nuclear	6 (100%)	8 (80%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	0,104 ^a
Variação anormal na							
anisocitose	1 (17%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Variação anormal no							
pleomorfismo celular	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Razão citoplasmática nuclear							
aumentada	1 (17%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Aumento do tamanho nuclear	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Figuras mitóticas atípicas	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Aumento do número e							
tamanho dos nucléolos	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Hipercromasia	6 (100%)	4 (40%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
Quantidade de alterações							
celulares	3.33±0.33	1.80±0.25	9.00±0.00*	9.00±0.00*	9.00±0.00*	9.00±0.00*	<0,001 ^b
Displasias de alto risco por							
padrão celular	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a

Displasias de alto risco por padrão cito-arquitetural	2 (33%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	10 (100%)*	<0,001 ^a
---	---------	--------	------------	-----------	-----------	------------	---------------------

* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo, ^aTeste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); ^bTeste ANOVA/Bonferroni (média \pm DP). GCN = grupo controle negativo; GCP = grupo controle positivo; GCABA = grupo controle Abatacept.

Figura 3: Somatório das mudanças cito-arquiteturais pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; † $p < 0,05$ versus grupo tratado apenas com 4NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

A análise do epitélio do dorso das línguas, segundo a classificação de Anneroth, revelou que os grupos controle negativo (100%), controle Abatacept (100%) e controle positivo (100%) apontaram o escore 1 (>50% de epitélio queratinizado). Já os grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com ABA por seis (56%), dez (100%) e dezoito (80%) semanas, apresentaram, de forma significativa, maior número de escore 3 (<20% de epitélio queratinizado associado a disceratose) ($p < 0,001$) (Tabela 2).

O grupo controle Abatacept apresentou maior frequência de escore 0 (100%) para pleomorfismo celular. No entanto, o grupo controle negativo (100%) e grupo controle positivo (40%) exibiram prevalência de escore 1. Os grupos controle positivo (60%) e o grupo co-tratado com ABA por seis (100%) semanas, apontaram maior frequência de escore 2. Apenas os grupos que receberam Abatacept por dez (44%) e dezoito (60%) semanas apresentaram o escore 3 (>50% pleomorfismo celular) ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Quanto ao padrão de invasão, os grupos controle negativo (100%), controle Abatacept (100%), controle positivo (80%) e co-tratado com ABA por seis (67%)

semanas exibiram escore 0, enquanto os grupos expostos ao 4NQO e co-tratado com ABA por dez (56%) e dezoito (50%) semanas, apresentaram escore 2 ($p=0,047$) (Tabela 2).

O infiltrado inflamatório esteve ausente (escore 0) nos grupos controle negativo (83%) e controle Abatacept (100%), já o grupo controle positivo (100%) e os co-tratados com ABA por seis (100%), dez (89%) e dezoito (100%) semanas revelaram maior frequência de escore 1 ($p<0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação microscópica através da classificação de Anneroth do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.

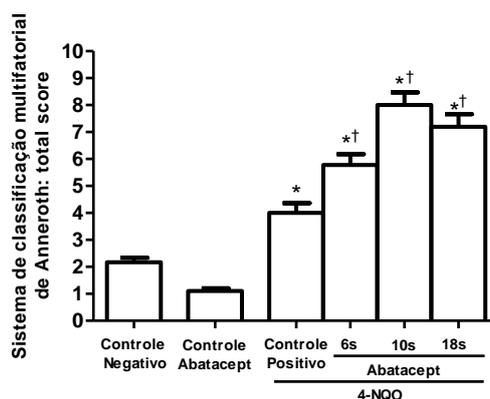
	4NQO						p-Valor
	GCN	GCABA	GCP	Abatacept			
				6 semanas	10 semanas	18 semanas	
Grau de queratinização							
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	<0,001^a
1	6 (100%)*	10 (100%)*	10 (100%)*	4 (44%)	0 (0%)	2 (20%)	
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (56%)*	9 (100%)*	8 (80%)*	
Pleomorfismo nuclear							
0	0 (0%)	10 (100%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	<0,001^a
1	6 (100%)*	0 (0%)	4 (40%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
2	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)*	9 (100%)*	5 (56%)	4 (40%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (44%)*	6 (60%)*	
Padrão de invasão							
0	6 (100%)*	10 (100%)*	8 (80%)*	6 (67%)*	3 (33%)	5 (50%)	0,047^a
1	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	
2	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	3 (33%)	5 (56%)*	5 (50%)*	
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	
Infiltrado Inflamatório							
0	5 (83%)*	10 (100%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	<0,001^a
1	1 (17%)	0 (0%)	10 (100%)*	9 (100%)*	8 (89%)*	10 (100%)*	
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

* $p<0,05$; ^aTeste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); GCN = grupo controle negativo; GCP = grupo controle positivo; GCABA = grupo controle Abatacept. Grau de queratinização, 0= ausência de alteração; 1= >50%; 2= entre 20 e 50%; 3 = <20% + Discreta. Pleomorfismo Nuclear, 0= ausência de alteração; 1= 25%; 2=50%; 3=>50%. Estágio de invasão, 0= ausência de alteração; 1= Invasão

questionável da lâmina própria; 2= Micro invasão da lâmina própria; 3= Invasão extensiva de tecidos adjacentes. Infiltrado inflamatório histio-linfoplasmocitário, 0= ausência de alteração; 1= Leve; 2= Moderada; 3= Intenso.

Na análise das alterações no epitélio pelo sistema de Anneroth, o total de escores mostrou que a média do grupo controle negativo ($2,16 \pm 0,16$), não exibiu diferença significativa com o grupo controle Abatacept. Todavia, o grupo controle positivo ($4 \pm 0,36$), os grupos expostos ao 4NQO e co-tratados com ABA por seis ($5,77 \pm 0,4$), dez ($8 \pm 0,47$) e dezoito ($7,2 \pm 0,46$) semanas, exibiram aumento significativo dos parâmetros analisados. Além disso, os grupos co-tratados com Abatacept também revelaram diferença estatística, comparados ao grupo controle positivo ($p < 0,001$) (Figura 4).

Figura 4: Total de escores dos parâmetros analisados através da classificação de Anneroth no epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; † $p < 0,05$ versus grupo tratado apenas com 4NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média ± EPM).

O desfecho dos achados microscópicos em epitélio de dorso de língua revelou diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,001$). O grupo controle negativo (100%) não teve alterações, assim como o GCABA (100%). O grupo controle positivo, (80%) desenvolveram displasia de alto grau, enquanto (22%) revelaram carcinoma microinvasor. Já o grupo 4NQO co-tratado com ABA por seis semanas, (22%) tiveram displasia de alto grau, (44%) carcinoma in situ e (33%) carcinoma microinvasor. O grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por dez semanas, (33%) carcinoma in situ e (67%) carcinoma microinvasor. Semelhantemente se deu no grupo submetido ao 4NQO

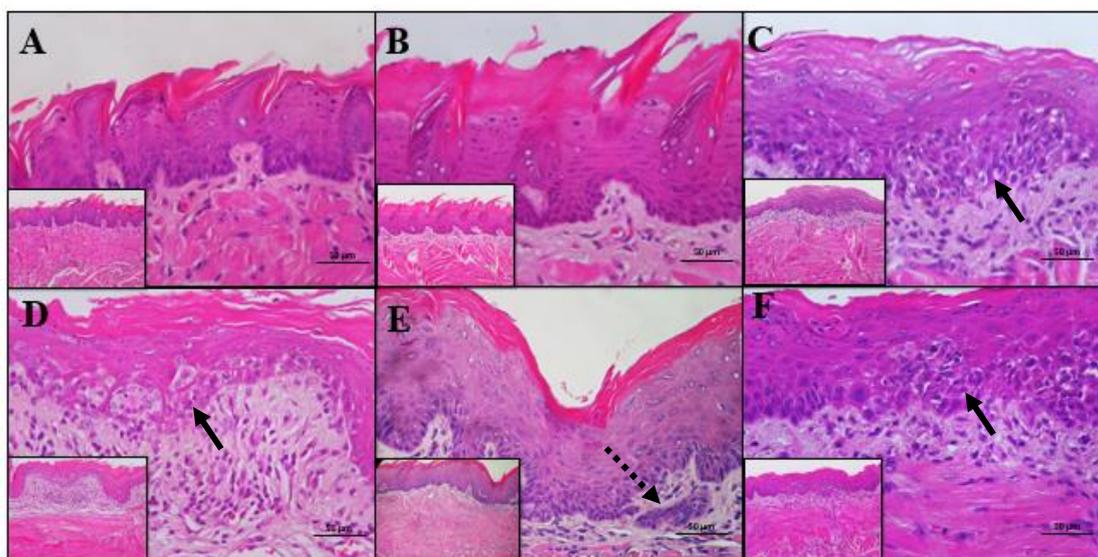
e co-tratado com Abatacept por dezoito semanas, (10%) exibiu displasia de alto grau, (44%) carcinoma in situ e (50%) carcinoma microinvasor (Tabela 3) (Figura 5).

Tabela 3: Desfecho microscópico dos achados do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.

Achado Microscópico	4NQO						p-Valor
	GCN	GCABA	GCP	Abatacept			
				6 semanas	10 semanas	18 semanas	
Sem alteração	6 (100%)*	10 (100%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	<0,001
Displasia Baixo Grau	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Displasia Alto Grau	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)*	2 (22%)	0 (0%)	1 (10%)	
Carcinoma in situ	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (44%)*	3 (33%)*	4 (44%)*	
Carcinoma microinvasor	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	3 (33%)	6 (67%)*	5 (50%)*	

*p<0,05; ^aTeste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); GCN = grupo controle negativo; GCP = grupo controle positivo; GCABA = grupo controle Abatacept.

Figura 5: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas;

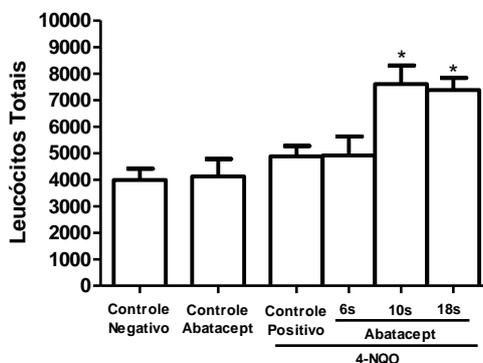
(F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas. Desorganização da camada basal (Seta Preta contínua). Ninho de células epiteliais invadindo a lâmina própria (Seta Preta pontilhada) (200x e 400x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tratamento com Abatacept interfere no perfil sistêmico de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO

O grupo controle negativo apresentou uma média (3988 ± 425 cél/mm³) de leucócitos circulantes ao final do experimento. O grupo controle Abatacept e o grupo tratado com 4NQO não expressaram diferença estatística. Contudo, o grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por 10 (7606 ± 696 cél/mm³) e 18 (7379 ± 461 cél/mm³) semanas mostraram significativo aumento no número total de leucócitos circulantes ($p < 0.001$) (Figura 6).

Figura 6: Perfil do total de leucócitos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.



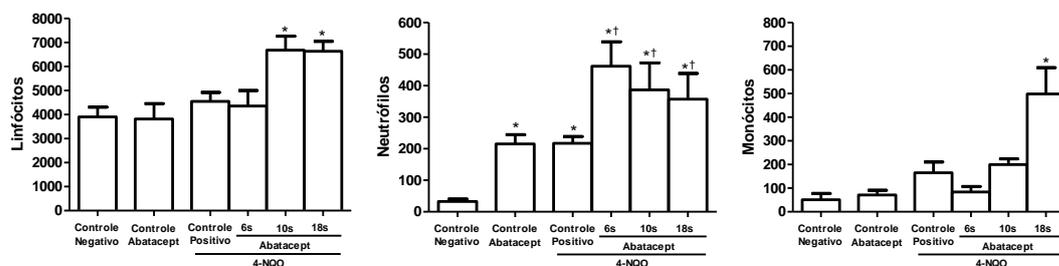
* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; † $p < 0,05$ versus grupo tratado apenas com 4NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

O grupo controle negativo apresentou uma média de (3904 ± 408 cél/mm³) linfócitos ao final do experimento. Não houve diferença significativa com os grupos controle Abatacept e nem com o 4NQO co-tratados por seis semanas com Abatacept. No entanto, os grupos 4NQO co-tratado com Abatacept por 10 (6686 ± 574 cél/mm³) e 18 (6636 ± 414 cél/mm³) semanas mostraram significativo aumento no número total de linfócitos circulantes ($p < 0.001$) (Figura 7).

Com relação ao número de neutrófilos, todos os grupos apresentaram aumento significativo no número de segmentados em relação ao grupo controle negativo (33 ± 7 cél/mm³), incluindo o grupo controle Abatacept (215 ± 30 cél/mm³) e controle positivo (217 ± 22 cél/mm³). Os grupos 4NQO co-tratados com Abatacept por seis (462 ± 77 cél/mm³), dez (389 ± 86 cél/mm³) e dezoito (357 ± 81 cél/mm³) semanas apresentaram maior número de neutrófilos que os grupos controle negativo e controle positivo ($p<0.001$) (Figura 7).

Quanto ao número de monócitos, o grupo controle negativo apresentou uma média de (51 ± 27 cél/mm³) monócitos ao final do protocolo experimental. Não foi verificada diferença estatística em relação aos grupos controle Abatacept, controle positivo e nem aos grupos 4NQO co-tratados com Abatacept por seis e dez semanas. Entretanto, o grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por dezoito (498 ± 111 cél/mm³) semanas mostrou diferença estatística no aumento do número de monócitos em relação ao controle negativo. ($p<0.001$) (Figura 7).

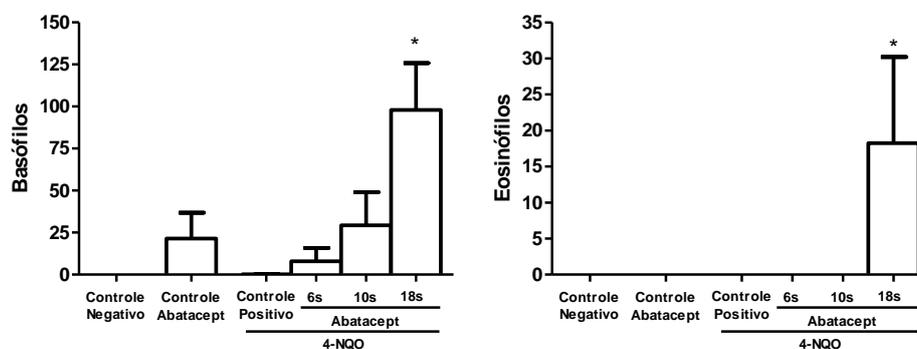
Figura 7: Perfil de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.



* $p<0,05$ versus grupo controle negativo; † $p<0,05$ versus grupo tratado apenas com 4NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

Em relação ao número de basófilos, o grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por 18 (98 ± 28 cél/mm³) semanas, foi o único que apresentou aumento significativo de basófilos, quando comparado com o grupo controle negativo. ($p<0.001$) (Figura 8). Semelhantemente, foi a expressão de eosinófilos, uma vez que este mesmo grupo (4NQO co-tratado com Abatacept) por 18 (18 ± 12 cél/mm³) semanas, mostrou diferença significativa em relação aos demais grupos controles e co-tratados (0 ± 0) ($p=0.04$) (Figura 8).

Figura 8: Perfil de basófilos e eosinófilos circulantes em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos de tempo.

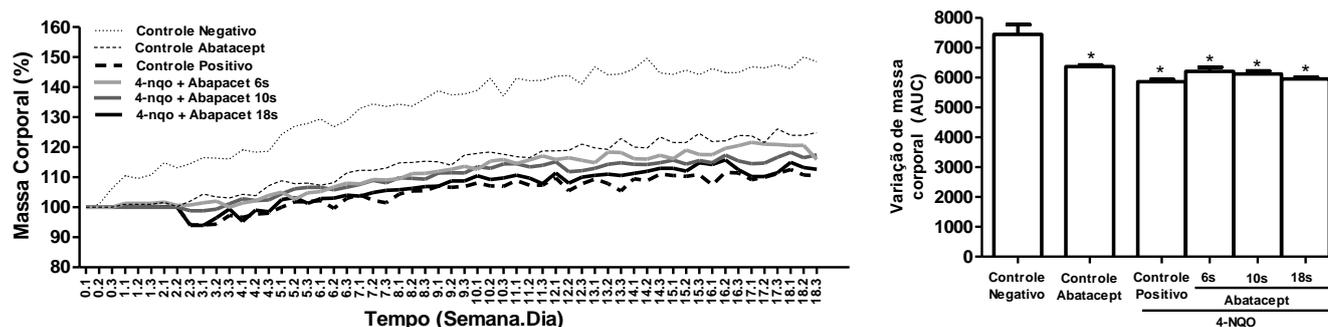


* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

Camundongos submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept sofrem alterações na massa corpórea

Todos os animais em estudo ganharam massa corpórea ao longo do protocolo experimental, mas houve diferença no ganho de cada grupo ($p < 0.001$). O grupo controle negativo apresentou um ganho maior que todos os demais analisados ($p < 0.001$). Os grupos, controle Abatacept, controle positivo e que receberam 4NQO co-tratados com Abatacept por seis, dez e dezoito semanas, mostraram um ganho de massa corpórea inferior ao grupo controle negativo de forma significativa. ($p < 0.001$) (Figura 9).

Figura 9: Análise da massa corpórea em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos.



* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

Co-tratamento com Abatacept em camundongos submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO interfere em aspectos histológicos do trato gastrointestinal.

A avaliação histopatológica do esôfago em todos os grupos experimentais mostrou epitélio pavimentoso estratificado hiperortoceratinizado preservado, bem como tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado. O grupo controle positivo, assim como os co-tratados com Abatacept, apresentaram aumento da incidência de focos inflamatórios em submucosa, quando comparados com o grupo controle negativo ($p < 0,001$) (Tabela 4). O pleomorfismo basal do epitélio do esôfago revelou aumento significativo no grupo submetido apenas ao carcinógeno (60%) e nos grupos co-tratados com Abatacept por seis (67%), dez (56%) e dezoito (50%) semanas, comparados ao grupo controle negativo (17%) ($p = 0,021$) (Tabela 4). Da mesma maneira, foi visto o aumento significativo de mitose e células apoptóticas no grupo tratado com 4NQO e nos grupos co-tratados com Abatacept, em relação ao grupo controle negativo (17%) ($p = 0,001$) (Tabela 4) (Figura 10)

A mucosa gástrica analisada estava íntegra em todos os grupos, da mesma forma que o epitélio pavimentoso estratificado hiperortoceratinizado da cárdia estava preservado, sem diferenças significativas. Alterações como infiltrado inflamatório, hemorragia e rarefação foram avaliadas. Entretanto, não revelaram diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p = 0,093$) (Tabela 4) (Figura 11). Ocasionalmente, foi detectada metaplasia intestinal na mucosa gástrica nos grupos grupo controle negativo e 4NQO co-tratados com Abatacept por 6, 10 e 18 semanas. No entanto, somente com um caso em cada um.

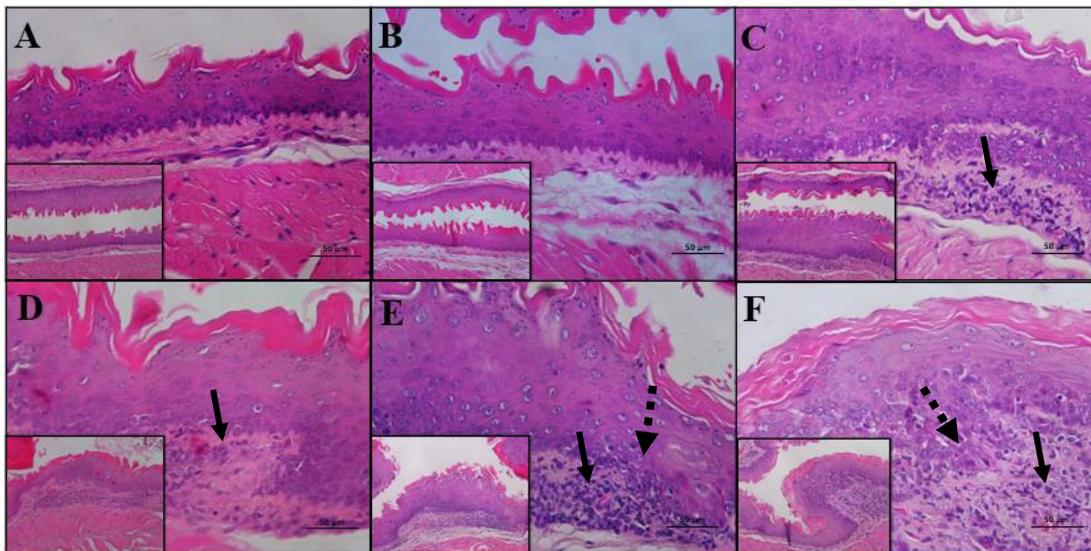
Alteração significativa encontrada no intestino delgado foi o aumento da incidência de inflamação crônica no grupo controle positivo (40%), quando comparado ao grupo controle negativo (0%). Já os grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com o imunossupressor por 10 (0%) e 18 (0%) semanas, revelaram uma diminuição significativa em relação ao controle positivo. ($p = 0,043$) (Tabela 4). Em relação a vacuolização e ao edema, o grupo 4NQO co-tratado com Abatacept por 18 (70%) semanas expressou aumento significativo, quando comparado ao controle negativo (33%) e ao controle positivo (50%) ($p = 0,023$) (Tabela 4) (Figura 11).

Tabela 4: Avaliação microscópica do esôfago, estômago e intestino delgado de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.

	4NQO						p- Valor
	GCN	GCABA	GCP	Abatacept			
				6 semanas	10 semanas	18 semanas	
Esôfago							
Epitélio contínuo	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	8 (89%)	9 (90%)	0,572 ^a
Vasos ectásicos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	0,404 ^a
Foco inflamatório submucosa	2 (33%)	0 (0%)	8 (80%)*	9 (100%)*	4 (44%)*	7 (70%)*	<0,001 ^a
Tampões ceratina	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	4 (44%)	3 (33%)	2 (20%)	0,143 ^a
Pleomorfismo basal	1 (17%)	0 (0%)	6 (60%)*	6 (67%)*	5 (56%)*	5 (50%)*	0,021 ^a
Mitose e Células apoptóticas	1 (17%)	0 (0%)	8 (80%)*	6 (67%)*	6 (67%)*	7 (70%)*	0,001 ^a
Somatório de alterações	1.67±0.49	1.00±0.00	4.20±0.29*	3.78±0.36*	3.00±0.53*	3.40±0.48*	<0,001 ^b
Estômago							
Mucosa fúndica preservada	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	8 (89%)	10 (100%)	0,404 ^a
Mucosa fúndica rarefeita	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000 ^a
Hemorragia(fundo)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000 ^a
Foco inflamatório(fundo)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000 ^a
Cárdia Epitélio	5 (83%)	9 (90%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	0,369 ^a
Cárdia Vasos ectásicos	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0,335 ^a
Foco inflamatório(cárdia)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	3 (33%)	0 (0%)	1 (10%)	0,134 ^a
Metaplasia Intestinal Mucosa							
Gástrica	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	1 (11%)	1 (10%)	0,730 ^a
Somatório de alterações	2.17±0.31	1.90±0.10	2.20±0.13	2.56±0.18	2.00±0.17	2.20±0.13	0,093 ^b
Intestino delgado							
Achatamento vilos	3 (50%)	1 (13%)	5 (50%)	0 (0%)	4 (44%)	2 (20%)	0,087 ^a
Perda das criptas	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000 ^a
Inflamação aguda	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000 ^a
Inflamação crônica	0 (0%)	1 (13%)	4 (40%)*	3 (33%)	0 (0%) [†]	0 (0%) [†]	0,043 ^a
Vacuolização / Edema	2 (33%)	0 (0%)	5 (50%)	4 (44%)	1 (11%)	7 (70%)* [†]	0,023 ^a
Camada muscular preservada	6 (100%)	8 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	1,000 ^a
Vasos ectásicos	1 (17%)	0 (0%)	3 (30%)	1 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0,155 ^a
Somatório de alterações	2.00±0.37	1.11±0.20*	2.70±0.42	1.89±0.26 [†]	1.56±0.18 [†]	1.90±0.23 [†]	0,009 ^b

*p<0,05 versus grupo controle negativo, [†]p<0,05 versus GCP; ^aTeste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); ^bTeste ANOVA/Bonferroni (média ± DP). GCN = grupo controle negativo; GCP = grupo controle positivo; GCABA = grupo controle Abatacept.

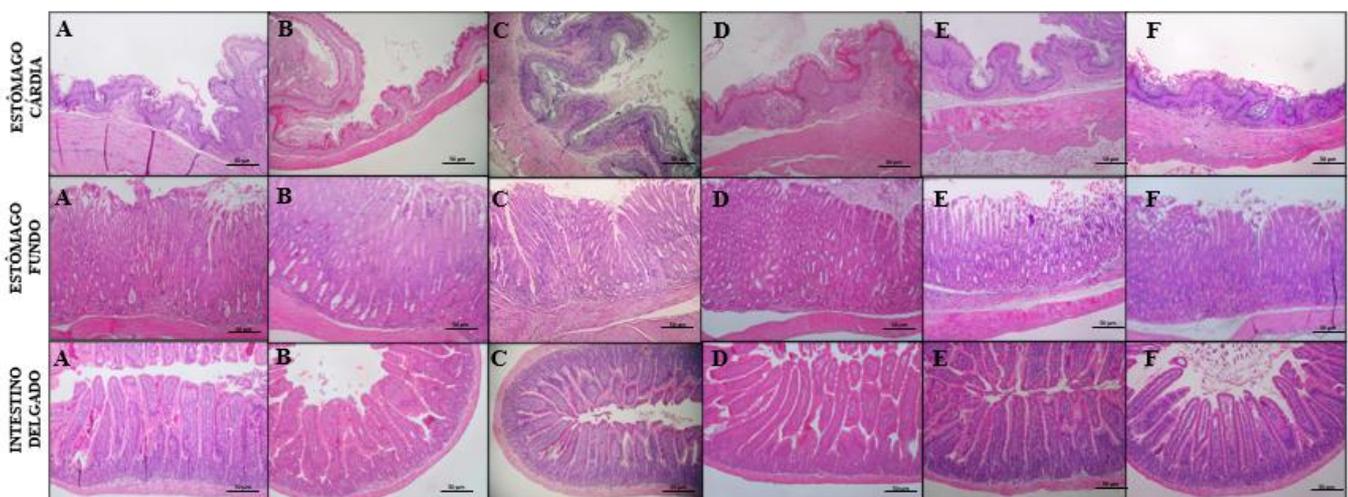
Figura 10: Fotomicrografias do esôfago de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas; (F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas. Infiltrado Inflamatório em submucosa (Seta preta contínua), Pleomorfismo da camada basal (Seta preta pontilhada) (200x e 400x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11: Fotomicrografias do estômago e intestino delgado de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas; (F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas (100x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor

O grupo controle positivo (4.20 ± 0.29) e os grupos co-tratados com Abatacept por seis (3.78 ± 0.36), dez (3.00 ± 0.53) e dezoito (3.40 ± 0.48) semanas apresentaram diferença estatística no somatório de alterações microscópicas no esôfago, quando comparados com o grupo controle negativo (1.67 ± 0.49) ($p < 0,001$) (Tabela 4). Distintivamente, a análise do somatório de alterações na mucosa gástrica não revelou diferenças significativas ($p = 0,093$) (Tabela 4). O grupo controle Abatacept (1.11 ± 0.20) apresentou declínio estatístico no somatório de alterações no intestino delgado em relação ao controle negativo (2.00 ± 0.37), enquanto os grupos co-tratados com seis (1.89 ± 0.26) dez (1.56 ± 0.18) e dezoito (1.90 ± 0.23) semanas mostraram diminuição significativa, quando comparado com o grupo controle positivo. (2.70 ± 0.42) ($p = 0,009$) (Tabela 4).

Co-tratamento com Abatacept em camundongos submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO altera aspectos histológicos de órgãos viscerais

A massa do fígado do grupo controle negativo apresentou uma média de 2.17 ± 0.03 g ao final do experimento. O grupo controle Abatacept e o grupo controle positivo não mostraram nenhuma diferença significativa. Já os grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com Abatacept durante 6 (1.87 ± 0.08 g), 10 (1.90 ± 0.02 g) e 18 (1.91 ± 0.02 g) semanas mostraram uma redução significativa na massa do fígado ($p = 0,005$) (Tabela 5).

Do mesmo modo, alterações na massa do baço foram observadas. Todos os grupos que receberam 4NQO durante o estudo, revelaram diminuição da massa esplênica, envolvendo o grupo 4NQO (0.13 ± 0.01 g), grupos co-tratados com Abatacept por seis (0.14 ± 0.01 g), dez (0.13 ± 0.01 g) e dezoito (0.13 ± 0.00 g) semanas, uma vez comparados com os demais grupos, como controle negativo que mostrou uma média (0.17 ± 0.01 g) ($p = 0,007$) (Tabela 5). Semelhantemente, ocorreu com o rim, visto que os grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com Abatacept por 10 (0.30 ± 0.01 g) e 18 (0.28 ± 0.01 g) semanas sofreram redução da massa renal, comparados com o controle negativo (0.36 ± 0.01 g) que não mostrou diferença estatística. ($p < 0,001$) (Tabela 5).

A análise da toxicidade hepática apresentou, em todos os grupos estudados tumefação celular, degeneração hidrópica de hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer, bem como hemorragia sinusoidal, sem diferença estatística nesses parâmetros.

O grupo controle negativo mostrou alta prevalência (83%) de focos inflamatórios e não houve diferença no grupo controle positivo (100%). Entretanto, o grupo controle Abatacept (30%) revelou uma diminuição significativa de focos inflamatórios, quando comparados com o grupo controle negativo. Bem como o grupo que recebeu 4NQO e co-tratado com ABA por 6 semanas (22%) em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,001$) (Tabela 5). A necrose focal de hepatócitos apresentou um aumento significativo no grupo controle positivo (80%), se comparado ao grupo controle negativo. Entretanto, os grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com ABA seis (22%), dez (11%) e dezoito (0%) semanas, mostraram uma diminuição estatística em relação ao grupo controle positivo (80%) ($p < 0,001$) (Tabela 5) (Figura 12).

Tabela 5: Avaliação microscópica do fígado, baço e rim de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.

	GCN	GCABA	GCP	4-NQO			p-Valor
				Abatacept			
				6 semanas	10 semanas	18 semanas	
Fígado							
Hepatócito Tumefação							
Degeneração hidrópica	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (90%)	1,000 ^a
Hiperplasia céls Kupffer	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	1,000 ^a
Hemorragia sinusoidal	6 (100%)	9 (90%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	0,482 ^a
Foco inflamatório	5 (83%)	3 (30%)*	10 (100%)	2 (22%) [†]	8 (89%)	4 (40%)	0,001^a
Esteatose Microvesicular	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (22%)	1 (11%)	0 (0%)	0,286 ^a
Necrose focal hepatócitos	0 (0%)	3 (30%)	8 (80%)*	2 (22%) [†]	5 (55%) [†]	0 (0%) [†]	0,001^a
Somatório de alterações	4.00±0.26	3.50±0.34*	4.80±0.13	3.67±0.29* [†]	4.56±0.24	3.40±0.16* [†]	<0,001^b
Massa (g)	2.17±0.03	2.05±0.04	1.98±0.04	1.87±0.08*	1.90±0.02*	1.91±0.02*	0,005^b
Baço							
Manutenção							
Proporcionalidade Polpa Branca/vermelha	5 (83%)	7 (70%)	6 (60%)	5 (56%)	6 (67%)	4 (40%)	0,594 ^a
Hemorragia	6 (100%)	7 (70%)	9 (90%)	9 (100%)	8 (89%)	10 (100%)	0,120 ^a
Somatório de alterações	1.83±0.17	1.40±0.22	1.50±0.17	1.56±0.18	1.33±0.29	1.40±0.16	0,708 ^b
Quantidade de	10.93±0.72	6.14±0.66	7.96±0.64	9.76±1.10	20.67±1.77* [†]	12.04±0.66 [†]	<0,001^b

megacariócitos							
Massa (g)	0.17±0.01	0.15±0.01	0.13±0.01*	0.14±0.01*	0.13±0.01*	0.13±0.00*	0,007^b
Rim							
Tumefação celular	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	1,000a
Infiltrado Inflamatório Perivascular (Medula)	2 (33%)	2 (20%)	7 (70%)*	6 (66%)*	8 (89%)*	4 (40%)*†	0,005^a
Infiltrado inflamatório Intersticial (Córtex)	3 (50%)	1 (10%)	8 (80%)*	3 (33%)†	3 (33%)†	3 (30%)†	0,009^a
Cilindros hialinos	3 (50%)	10 (100%)*	8 (80%)*	9 (100%)*	9 (100%)*	9 (90%)*	0,019^a
Hemorragia	6 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (100%)	9 (100%)	10 (100%)	1,000a
Somatório de alterações	4.17±0.48	5.30±0.15	6.10±0.35*	5.44±0.18*	6.56±0.24*	5.20±0.29*	<0,001^b
Massa (g)	0.36±0.01	0.36±0.01	0.31±0.01	0.33±0.01	0.30±0.01*	0.28±0.01*	<0,001^b

*p<0,05 versus grupo controle negativo, †p<0,05 versus GCP; ^aTeste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); ^bTeste ANOVA/Bonferroni (média ± DP). GCN = grupo controle negativo; GCP = grupo controle positivo; GCABA = grupo controle Abatacept.

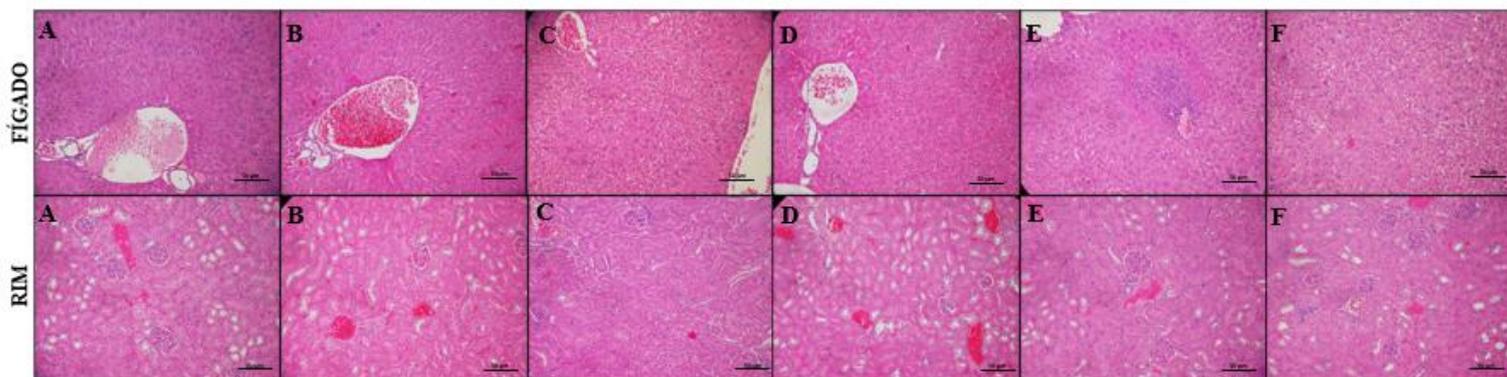
A análise microscópica renal evidenciou tumefação tubular em todos os grupos analisados sem diferenças significativas. Também foi visto aumento significativo da incidência de infiltrado inflamatório perivascular (medula) no grupo controle positivo (70%), nos grupos co-tratados com Abatacept por seis (66%), dez (89%) e dezoito (40%) semanas, em relação ao grupo controle negativo (33%). O grupo que recebeu o imunossupressor por 18 semanas, mostrou diminuição da inflamação em relação ao controle positivo. Aumento significativo de infiltrado inflamatório intersticial (córtex) foi observado no grupo controle positivo (80%), comparado ao grupo controle negativo (50%), entretanto os grupos 4NQO e co-tratados com Abatacept por seis (33%), dez (33%) e dezoito (30%) semanas revelaram um declínio significativo em relação ao grupo controle positivo. (p=0,005) (Tabela 5) (Figura 12).

Todos os grupos experimentais mostraram aumento na presença de cilindro hialinos, incluindo grupo controle Abatacept (100%), grupo controle positivo (80%), 4NQO e co-tratados com ABA por seis (100%), dez (100%) e dezoito (90%) semanas em comparação com o grupo controle negativo (50%) (p=0,019) (Tabela 5) (Figura 12).

A análise dos baços mostrou manutenção da proporcionalidade entre as polpas brancas e vermelhas em todos os grupos e não houve alterações significativas desse achado (p=0,708) (Tabela 4). O número de megacariócitos esplênicos no grupo submetido ao carcinógeno e co-tratado com Abatacept por dez (20.67±1.77) e dezoito (12.04±0.66) semanas mostrou um aumento significativo comparados com os grupos controle negativo

(10.93 ± 0.72) e positivo (7.96 ± 0.64) ($p < 0,001$) (Tabela 5) (Figura 13).

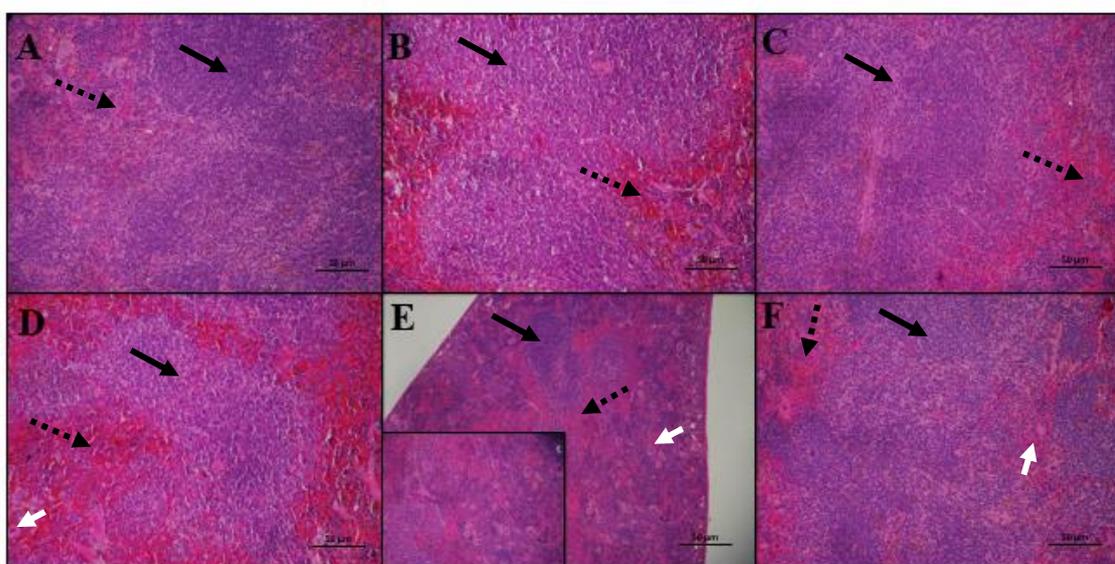
Figura 12: Fotomicrografias do fígado e rim de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas; (F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas (200x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13: Fotomicrografias do baço de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e co-tratados com Abatacept 16 mg/kg/semana em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle

positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas; (F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas. Polpa Branca (Seta Preta Contínua), Polpa Vermelha (Seta Preta Pontilhada), Megacariócitos (Seta Branca) Conjunto de Megacariócitos (Em detalhe) (200x e 400x, Hematoxilina-Eosina).

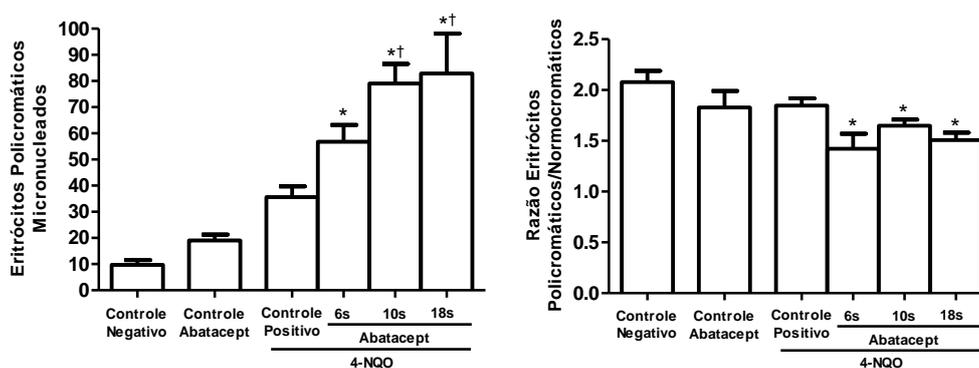
Fonte: Elaborada pelo autor.

Modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratamento com Abatacept induz danos cromossômicos estruturais

O grupo controle negativo revelou uma média de (9667±1838) de eritrócitos policromáticos micronucleados, já o grupo controle ABA e controle positivo não mostraram diferença. No entanto, os grupos expostos ao 4NQO e co-tratados com ABA por seis (5680±641), dez (7900±757) e dezoito (8286±153) semanas apresentaram um aumento significativo de células micronucleadas. Além disso, os grupos co-tratados com ABA por dez (79±8) e dezoito (83±15) semanas foram estatisticamente diferentes quando comparados ao controle positivo (36±4) ($p < 0,001$) (Figura 14 e 15).

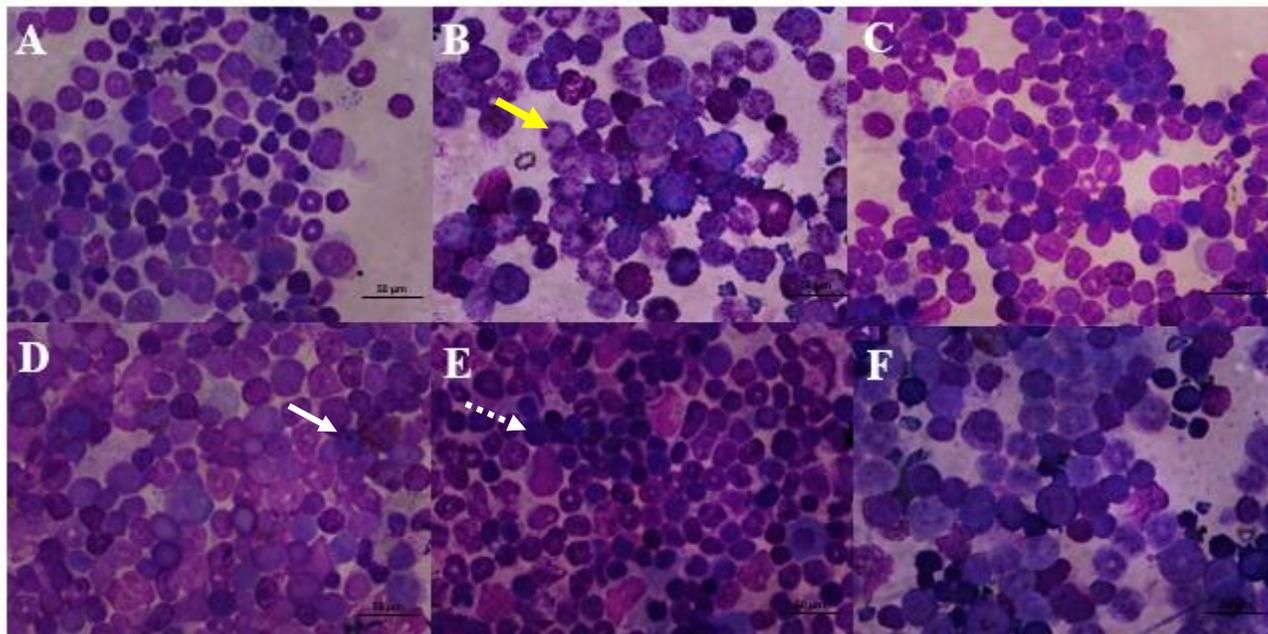
Na análise da razão de eritrócitos policromáticos e normocromáticos, o grupo controle negativo mostrou uma média de (2,08±0,11), sem diferença significativa nos grupos controle ABA e controle positivo. Diferentemente, nos grupos submetidos ao 4NQO e co-tratados com ABA por seis (1,42±0,15), dez (1,64±0,06) e dezoito (1,50±0,07) semanas, revelaram diminuição significativa dessa razão ($p = 0,009$) (Figura 14).

Figura 14: Perfil de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados e razão de Eritrócitos Policromáticos e Normocromáticos em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos.



* $p < 0,05$ versus grupo controle negativo; † $p < 0,05$ versus grupo tratado apenas com 4NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média \pm EPM).

Figura 15: Fotomicrografias de Eritrócitos Policromáticos e Eritrócitos Normocromáticos em camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese oral por 4NQO e co-tratados com Abatacept 16mg/kg/semana por diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCABA = grupo controle Abatacept; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) ABA6= 4NQO+ Abatacept por 6 semanas; (E) ABA10= 4NQO+ Abatacept por 10 semanas; (F) ABA18= 4NQO+ Abatacept por 18 semanas. Eritrócito Normocromático (Seta Amarela). Eritrócito Policromático (Seta Branca Pontilhada). Eritrócito Policromático Micronucleado (Seta Branca Contínua) (1000x, Wright).

Fonte: Elaborada pelo autor.

8 DISCUSSÃO

O modelo de carcinogênese oral empregado nesse estudo, através da aplicação tópica do 4NQO em dorso de língua de camundongos, foi capaz de possibilitar a visualização de displasias severas, bem como carcinomas microinvasor. Entretanto, há diversos métodos de avaliar e gradar as displasias encontradas em diferentes estudos experimentais.

Dessa forma, observamos que o sistema binário de avaliação de displasias proposto por Kujan *et al.*, (2006), que complementa a classificação da OMS em 2005, é demasiadamente sensível em gradar as displasias em estudos animais, diminuindo a subjetividade da avaliação. Adicionalmente, a proposta de Anneroth é um método padrão para análises de carcinomas, de fácil compreensão e proporciona um resultado mais específico. Esse modelo de análise é mais robusto, revelando fidedignidade nos achados. Foi possível, portanto, visualizar diferenças dentro das displasias de alto risco e auxiliou no desfecho de carcinomas *in situ* e microinvasor, no presente estudo.

Evidências acerca do risco de desenvolvimento de câncer em usuários de Abatacept, comparado com drogas antirreumáticas modificadoras de doenças sintéticas e biológicas (DMARDs), são inconsistentes (SIMON *et al* 2019). Alguns estudos demonstraram baixas taxas de incidência para doenças malignas relacionada ao uso do ABA (WEINBLATT *et al.*, 2013; ALTEN *et al.*, 2014). Entretanto, Montastruc *et al.*, (2019), mostraram que o uso do Abatacept no tratamento da AR (artrite reumatoide) foi associado ao aumento do risco de câncer, especialmente ao câncer de pele não melanoma, quando comparado a outras drogas antirreumáticas.

Da mesma forma, Germay *et al.*, (2020) em seu estudo observacional, notaram que o Abatacept não esteve associado ao aumento de câncer no geral, porém na análise por locais específicos, mostrou risco aumentado para melanoma. Bem como, Wadström *et al.*, (2017) em um estudo de coorte prospectivo, encontraram que para o primeiro câncer de pele de células escamosas invasivo, o Abatacept apontou um risco aumentado em relação aos demais medicamentos analisados (HR, 2,15; IC de 95%, 1,31-3,52).

No modelo apresentado, o grupo controle positivo apresentou em seu desfecho alta frequência de displasia alto grau, e o grupo exposto ao 4NQO e co-tratado com ABA por seis semanas já evidenciou carcinoma *in situ*. Enquanto os grupos 4NQO co-tratados com ABA por dez e dezoito semanas resultaram em uma maior frequência de carcinoma microinvasor em relação aos demais grupos experimentais. Os achados apontam uma

relação tempo de exposição dependente, pela administração do carcinógeno associado ao imunossupressor. Simon *et al.*, (2009) afirmam que uso a longo prazo do Abatacept necessita de investigações minuciosas e acompanhamento rigoroso desses pacientes, o que corrobora com os achados do nosso estudo, uma vez que os grupos submetidos ao ABA mostraram maior frequência de carcinoma *in situ* e microinvasor.

Yoshiji *et al.* em 2019 relatou um caso de uma paciente que exibiu rápida progressão de carcinoma hepatocelular após terapia com Abatacept para AR. Dessa forma, pesquisadores inferiram possível influência do Abatacept no crescimento tumoral e ainda afirma a importância da vigilância do tumor em casos de co-tratamento com ABA. Infelizmente, o risco de neoplasias malignas em pacientes com AR tratadas com DMARDs, rituximabe, Abatacept e tocilizumabe é pouco investigado, consequentemente os mecanismos envolvidos são pouco elucidados. (WADSTRÖM *et al.*, 2017).

O Abatacept é uma molécula que mimetiza a ação do CTLA-4, que é responsável por interromper a interação coestimulatória B7 (CD80/86) / CD28 e, assim, inibe a ativação e proliferação de células T eficazes. Hyeok-Jae Ko *et al.*, (2010) verificaram que a ação conjunta do CTLA-4 Ig com TGF- β é capaz de aumentar a população de Tregs, bem como ocasionar a modificação das Células Dendríticas (CDs) em CDs tolerogênicas. Portanto, Albers *et al.*, (2005) demonstraram em seu estudo que no microambiente do carcinoma de células escamosas oral (CCEO), a ação de linfócitos Tregs pode resultar em prejuízos na defesa antitumoral do hospedeiro. Bem como, foi relacionado altos níveis de Tregs em pacientes com CCEO com o mau prognóstico. (HANAKAWA *et al.*, 2014)

Mukherjee *et al.*, (2020) observaram que altos níveis de infiltração de células T CD8 + está fortemente associada à melhora da sobrevida do paciente, assim como níveis significativamente maiores no microambiente tumoral de Granzima B foram encontrados em tumores em estágio T1-T2 em relação a tumores T3-T4, atribuindo a morte de células tumorais, via Granzima B. Também foi constatado contagens elevadas de CD4+ em tumores em menor estágio. Então, a supressão dessa resposta pelo tratamento com Abatacept parece estar associado a maior progressão dos achados displásicos no epitélio dos animais submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO como demonstrado nesse estudo.

A vista disso, nosso estudo através da análise hematológica, foi observado elevadas taxas significativas de linfócitos nos grupos co-tratados com Abatacept, quando comparados ao grupo controle negativo. Assim, podemos inferir ao aumento de linfócitos Treg via ação da CTLA-4 Ig, uma vez que, esse fármaco suprime células efetoras e

ocasiona a proliferação de linfócitos T reguladoras, por diversos caminhos (GARDNER, JEFFERY, SANSOM, 2014). Ademais, os grupos que receberam o co-tratamento com ABA, também expressaram aumento significativo na taxa de neutrófilos em relação aos demais.

A neutrofilia encontrada no microambiente tumoral (MT) pode estar relacionada a hipóxia, privação de nutrientes, à proliferação celular e à necrose que, conseqüentemente, liberam Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs). Por sua vez, recrutam e ativam neutrófilos, do mesmo modo que citocinas derivadas do tumor promovem diferenciação mieloide. As células granulocíticas são populações celulares recrutadas essencialmente no MT, já que moléculas do ponto de verificação imunológica, como CTLA-4, impossibilita a ação eficaz dos linfócitos T (SINGEL E SEGAL, 2016).

Ratificando, assim o aumento de neutrófilos encontrados nos grupos co-tratados, uma vez que apresentaram alterações citoarquiteturais e microinvasão da lâmina própria superiores aos demais animais, configurando um ambiente com alta liberação de DAMPs, além de terem sido submetidos ao CTLA-4 Ig.

Por outro lado, apesar de haver inconsistências nos estudos, é relatado o risco de infecções aumentado pela imunossupressão relacionado ao uso de DMARDs, na população com AR, incluindo infecções hospitalares, infecções oportunistas e tuberculose (SIMON *et al.*, 2019). Assim, podemos inferir que o aumento significativo de linfócitos e neutrófilos, nos grupos 4NQO co-tratados com Abatacept por 10 e 18 semanas. Bem como, o aumento estatístico também de monócitos, eosinófilos e basófilos no grupo submetido ao co-tratamento com ABA por 18 semanas pode estar relacionado a imunossupressão ocasionada pelo Abatacept e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um processo infeccioso.

Carrara *et al.*, (2019) relevou que os usuários de Abatacept apresentaram risco significativamente menor de infecções em comparação ao etanercepte. Diferentemente, de Simon *et al.*, (2019) demonstrou que os riscos de infecções foram semelhantes em pacientes com AR tratados com ABA ou outras DMARDs. Desse modo, a leucocitose observada pode estar vinculada a possíveis infecções oportunistas, entretanto sugere-se que trabalhos futuros façam hemocultura para descartar essa hipótese.

Com relação a toxicidade sistêmica, foi visto que a exposição dos camundongos ao 4NQO afetou a massa corpórea no início do protocolo experimental, quando comparado ao grupo controle negativo, que apresentou um ganho significativamente maior ($p < 0.001$). Semelhantemente ao encontrado por Ribeiro e Salvadori (2007) em que

o ganho de peso foi significativamente diferente entre os grupos estudados. Os animais tratados estavam, provavelmente, sob um efeito catabólico induzido pelo carcinógeno que tem sido fortemente descrito em estudos prévios. (BARCESSAT *et al.*, 2014).

Acerca dos efeitos tóxicos do 4NQO no estômago e intestino, não foram encontradas alterações significativas nos animais. Entretanto, no esôfago, focos inflamatórios, pleomorfismo da camada basal, mitoses, tal como, células apoptóticas foram significativamente maiores nos grupos submetidos ao carcinógeno. Tanaka, Kawabata e Sugie, (2017) realizaram a administração do 4NQO a camundongos em água potável, e ao analisar esôfago desses animais, foi encontrado lesões proliferativas e displásica demonstrando a capacidade que o carcinógeno tem após deglutição.

Ainda acerca das análises realizadas em nível sistêmico, as alterações histomorfológicas do fígado encontradas no grupo controle parecem estar relacionadas a exposição desses animais ao DMSO, uma vez que, no ensaio de atividade antitumoral de Vasconcellos *et al.*, (2017), os animais que receberam injeção de DMSO apresentaram alterações hepáticas semelhantes.

Logo, o grupo controle positivo, submetido apenas ao 4NQO, revelou aumento significativo de focos inflamatórios e necrose de hepatócitos em comparação aos outros grupos em análise. Barcessat *et al.*, (2014) afirmou que os animais expostos ao carcinógeno tiveram alterações na função hepática. Além disso, a principal alteração encontrada foi a necrose hepatocelular, semelhante ao presente estudo. Aumento da atividade das células Kupffer, infiltrado inflamatório e necrose focal de hepatócitos foi visto em animais tratados com 4NQO (VISWANADHA, SIVAN E SHENOI, 2011).

Em nosso estudo os grupos 4NQO co-tratados com CTLA-4 Ig, mostraram diminuição do número de animais com necrose focal de hepatócitos, provavelmente por atenuação do ABA. Ainda existe uma escassez de investigações acerca da toxicidade hepática após uso do Abatacept, Iwanaga *et al.*, (2014) relataram a ocorrência de lesão hepática grave em paciente com AR tratado com Abatacept. No entanto, os achados presentes não são corroborados por Iwanaga, uma vez que foi observado declínio no número de animais com infiltrado inflamatório, bem como necrose focal de hepatócitos.

Mudanças histopatológicas renais também foram observadas em animais após administração do Abatacept. Entretanto, a bula do Abatacept (Orencia®) relata que nenhum estudo formal foi conduzido para examinar os efeitos da insuficiência renal na farmacocinética do fármaco. Potencial toxicidade renal foi notada, possivelmente vinculado tanto ao 4NQO, quanto ao fármaco imunossupressor, pois todos os animais

expostos ao carcinógeno apresentaram aumento infiltrado inflamatório, bem como maiores taxas de cilindro hialino. Outro estudo também relatou alterações nos rins dos animais submetidos a aplicação tópica do agente cancerígeno (BARCESSAT *et al.*, 2014). Viswanadha, Sivan e Shenoi, (2011) confirmaram, por análises histopatológicas e bioquímicas, a relação de lesões renais após a administração do 4NQO na água de beber dos ratos, o que é justificado pelo excesso do estresse oxidativo nesses órgãos, uma vez que o 4NQO passa por ciclos redox e assim gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e a exposição a altas concentrações de ROS pode ocasionar danos intracelulares (KANOJIA, VAIDYA, 2005).

Ao examinar os baços, não houve diferença estatística entres os grupos no que se refere a manutenção da proporcionalidade entre polpa branca e vermelha e hemorragia. Diferentemente, Barcessat *et al.*, (2014) observaram, nos animais tratados com 4NQO, hiperplasia de polpa vermelha. Outro estudo correlacionou as alterações esplênicas em termos de citocinas liberadas pelas células tumorais que afetam o sistema imunológico, uma vez que os animais em análise desenvolveram carcinoma de células escamosas oral. (GANNOT, BUCHNER, KEISARI, 2004). O co-tratamento com Abatacept por 10 e 18 semanas revelou desregulação hematológica, devido ao aumento significativo de megacariócitos nesses grupos. Logo, podemos relacionar esse achado a um possível processo infeccioso que os animais estariam submetidos, em virtude do mecanismo de ação do ABA que ocasiona um quadro de imunossupressão nos usuários, aumentando, portanto, o risco de infecções (SIMON *et al.*, 2019).

A fim de avaliar a genotoxicidade de substâncias químicas, como o 4NQO, o teste de micronúcleo (MN) com eritrócitos de animais é uma análise padrão na toxicologia genética. Tal como, essa análise é considerada como marcador precoce para carcinogênese. (BONASSI *et al.*, 2003; OKADA *et al.*, 2013) Os MNs são formados durante o processo de divisão celular, principalmente na telófase, são constituídos por fragmentos cromossômicos acêntricos ou inteiros que foram perdidos no processo de divisão celular. Por esse motivo, a detecção de MNs retrata perda de cromatina por consequência de dano cromossômico estrutural. (BONASSI *et al.*, 2003)

As avaliações de genotoxicidade conduzidas em ratos Sprague Dawley machos tratados com 4NQO mostraram aumento da incidência de micronúcleo em células do sangue periférico em relação ao grupo controle (ZHOU *et al.*, 2014). Roberts *et al.*, (2016) revelaram em seu estudo experimental, que a administração de 4NQO aumentou a quantidade de dano genético detectável pelo ensaio de micronúcleo. Logo, nosso estudo

mostrou que os grupos submetidos à administração do carcinógeno e co-tratados com ABA exibiram aumento significativo de MNs nesses animais em relação ao grupo controle negativo. Dessa forma, podemos inferir uma ação indireta do Abatacept em ocasionar maiores danos genéticos, identificado por meio do ensaio de micronúcleos. Dado que esse fármaco é responsável por gerar imunossupressão no hospedeiro, diminuindo a ação de linfócitos efetores e, conseqüentemente, intensificando a ação do carcinógeno aplicado nos animais (SIMON *et al.*, 2019). Venkatesh *et al.*, (2007) constatou que o declínio na relação PCE/NCE está intimamente relacionado a morte de eritroblastos e remoção de células danificadas.

O modelo de carcinogênese oral utilizado nesse estudo, através da utilização do 4NQO, é um dos métodos mais aplicados para estudo experimental da patogênese do câncer de boca e possibilita a investigação do risco causado pelos agentes ambientais com potencial carcinogênico (RIBEIRO *et al.*, 2004; CUBUK *et al.*, 2020). No entanto, a toxicidade do 4NQO impossibilita a extensão do curso temporal do estudo por tempo o suficiente para desenvolvimento de lesões tumorais evidentes clinicamente.

Na presente pesquisa, observou-se uma redução significativa do peso e uma toxicidade sistêmica significativa, refletida na análise do sangue, medula e órgãos, ao passo que foi possível evidenciar bem alterações displásica e carcinoma microinvasor, como previamente publicado por CUBUK *et al.* (2020), mas ainda não, a instalação de um Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) propriamente dito. Talvez essas dificuldades sejam as principais responsáveis por existirem inúmeras diferenças no modo de aplicação do carcinógeno, na dose/concentração e no tempo de exposição (GANNOT, BUCHNER, KEISAR, 2004; TANG *et al.*, 2004).

Entretanto, vale ressaltar que o modelo de carcinogênese por meio da aplicação tópica do 4NQO resultou em baixa toxicidade sistêmica em órgãos como fígado, rim, baço e intestino delgado. Além disso, nenhuma toxicidade significativa foi observada em mucosa gástrica. Distintivamente dos modelos de carcinogênese em que a administração do carcinógeno ocorre através da água de beber dos animais, que provoca toxicidade sistêmica mais significativa e severa (WU *et al.*, 2018). A manifestação de alterações sistêmicas graves, bem como neoplasias nos demais órgãos podem modificar o desenvolvimento e o comportamento biológico da carcinogênese oral. Além do mais, diversos estudos que utilizam 4NQO não realizam análise morfológica de toxicidade de diferentes órgãos.

No entanto, é bem verdade, que os modelos de carcinogênese, quer por pincelamento ou através da adição do carcinógeno na água de beber, levam os animais ao sofrimento e, muitas vezes, pode haver perda precoce de animais, dificultando a manutenção do experimento por longo período. Esta constituiu-se uma limitação do nosso estudo, principalmente, com os animais do grupo de 18(dezoito) semanas de protocolo.

Todavia, demonstrou-se a ocorrência de piora significativa das displasias de alto grau, como também, de carcinomas in situ e microinvasor, no epitélio do dorso de língua dos animais submetidos ao modelo experimental de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO, quando da associação com Abatacept. No entanto, há uma escassez de estudos científicos que analisam o risco de desenvolvimento de malignidades em pacientes que fazem uso de imunossupressores. Dessa forma, é de extrema necessidade a investigação dessa relação em ensaios clínicos.

9 CONCLUSÃO

O modelo de carcinogênese oral, induzido por 4NQO, é capaz de produzir displasias e carcinomas, além de provocar leve toxicidade sistêmica no esôfago, em órgãos viscerais e danos genéticos. O co-tratamento com CTLA-4-Ig acelerou o processo de carcinogênese de forma tempo-dependente, levando a uma rápida progressão das displasias e instalação de carcinoma microinvasor, além da potencialização da desregulação hematológica e do dano cromossômico estrutural induzido pelo 4NQO.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.580. 2019.

AKHTER, M. *et al.* A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, n. 2, p. 168, 2011.

ALBERS, A. E. *et al.* Immune responses to p53 in patients with cancer:enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 11, p. 1072–1081, 2005.

ALTEN, R. *et al.* Long-Term Safety of Subcutaneous Abatacept in Rheumatoid Arthritis: Integrated Analysis of Clinical Trial Data Representing More Than Four Years of Treatment, **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 8, p. 1987–1997, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures** 3rd Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

ANDRADE, V. P. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-60, fev. 2007.

ANNEROOTH, G.; HANSEN, L. S.; SILVERMAN, S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **J Oral Pathol.**, v. 15, n. 3, p. 162-8, Mar 1986.

BARBIERI, D. F. *et al.* Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 114–119, 2010.

BARCESSAT, A. R. R. *et al.* Systemic toxic effects during early phases of topical 4NQO-induced oral carcinogenesis in rats. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 10, p. 770–777, nov. 2014.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 31,

n. 184, p.50-57, 1 jul. 2002.

BOFFETTA, P.; NYBERG, F. Contribution of environmental factors to cancer risk. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 71–94, 1 dec. 2003.

BONASSI, S. *et al.* Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 2, p. 155–166, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Estimativa 2020, Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, Inca, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer- INCA**, Falando Sobre Câncer da Boca. – Rio de Janeiro: INCA, 2002 52 p.

BRIZENO, L.A.C. *et al.* Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of. **Life Sciences**, v. 155, p. 36–47, 2016.

CANALES-AGUIRRE, A. *et al.* Genotoxic Effect of Chronic Exposure to DDT on Lymphocytes, Oral Mucosa and Breast Cells of Female Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 2, p. 540–553, 18 fev. 2011.

CARRARA, G. *et al.* Risk of hospitalisation for serious bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics. Analysis from the Record linkage On Rheumatic Disease study of the Italian Society for Rheumatology. **Clin Exp Rheumatol**, v.37, p.60-66, 2019.

CARRARD, V.C. *et al.* Teste de micronúcleos - Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade Odontológica Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 48, n. 3, p.77-81, 14 dez. 2007.

CUBUK, S. *et al.* The efficiency of propranolol on occurrence and development of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced squamous cell carcinoma of the tongue in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 24, n. 2, p. 400, 2020.

DE VASCONCELLOS, M. C. *et al.* Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1416–1421, 2007.

FANG, J. *et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 375, 2017.

FREEMAN, G. J. *et al.* CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 149, n. 12, p. 3795–3801, 15 dec. 1992.

GANNOT, G.; BUCHNER, A.; KEISARI, Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. **Oral Oncology**, v. 40, n. 3, p. 287–297, mar. 2004.

GARDNER, D.; JEFFERY, L. E.; SANSOM, D. M. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 9, p. 1985–1991, 2014.

GEMMELL, E. *et al.* Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues. **Journal of Periodontal Research**, v. 36, n. 2, p. 92–100, APR. 2001.

GERMAY, S. *et al.* Abatacept and the Risk of Cancer: A World Observational Postmarketing Study. **SSRN Electronic Journal**, 2019.

GOES, P. *et al.* Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 45–54, 2014.

GREAVES, P. **Histopathology of preclinical toxicity studies: interpretation and relevance in drug safety evaluation**. 3rd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/AP, 2007.

HANAKAWA, H. *et al.* Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 134, n. 8, p. 859–864, 2014.

HIGGINSON, J. Environmental Carcinogenesis. **Cancer Supplement**, Washington, v. 72, n. 3, p.971-977, 1 aug. 1993.

HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R. **Imunologia para Odontologia**. São Paulo: Artmed Editográfica, 312p. 2006.

HOUGHTON, A. N.; UCHI, H.; WOLCHOK, J. D. The role of the immune system in early epithelial carcinogenesis: B-ware the double-edged sword. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 403–405, may 2005.

HSU, S.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotinperoxidase complex in immunoperoxidase technics. **American journal of clinical pathology**, v. 75, n. 6, p. 816-821, 1981.

HYEOK-JAE KO. *et al.* CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 2, p. 111–120, 2010.

IBA, A. *et al.* Tuberculosis screening and management of latent tuberculosis infection prior to biologic treatment in patients with immune-mediated inflammatory diseases: A longitudinal population-based analysis using claims data. **Health Science Reports**, v. 3, n. 4, 2020.

IWAHASHI, C. *et al.* CTLA4-Ig suppresses development of experimental autoimmune uveitis in the induction and effector phases: Comparison with blockade of interleukin-6. **Experimental Eye Research**, v. 140, p. 53–64, nov. 2015.

IWANAGA, N. *et al.* Rheumatoid arthritis complicated with severe liver injury during treatment with Abatacept. **Modern Rheumatology**, v. 24, n. 5, p. 874–876, 2014.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto & Atlas: Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 42, n. 7, p. 655–667, aug. 2006.

KAPLAN, I.; HOCHSTADT, T.; DAYAN, D. PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. **Medicina Oral: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Medicina Oral Y De La Academia Iberoamericana De Patologia Y Medicina Bucal**, v. 7, n. 5, p. 336–343, dec. 2002.

KLIWINSKI, C. *et al.* Prophylactic administration of Abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. **Journal of Autoimmunity**,

v. 25, n. 3, p. 165–171, nov. 2005.

KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature medicine**, v. 4, n. 7, p. 844, 1998.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 155–166, 2000.

KRISTENSEN, S. D. *et al.* The relationship between increased platelet count and megakaryocyte size in bronchial carcinoma. **British Journal of Haematology**, v. 81, n. 2, p. 247–251, 1992.

KUJAN, O. *et al.* Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, nov. 2006.

LEE, J. W. *et al.* Age and Gender Effects on Genotoxicity in Diesel Exhaust Particles Exposed C57BL/6 Mice. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, 2021.

LIBBY, P.; LICHTMAN, A. I. Modulating Adaptive Immunity in Vascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 14, p. 1824–1826, apr. 2019.

LINSLEY, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 3, p. 561–569, 1 sep. 1991.

LON, H.K. *et al.* Modeling Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of Abatacept and Disease Progression in Collagen-Induced Arthritic Rats - A Population Approach. **J Pharmacokinetic Pharmacodyn.** n. 40, v.6, p. 701–712, 2013.

LORENZETTI, R. *et al.* Abatacept modulates CD80 and CD86 expression and memory formation in human B-cells. **Journal of Autoimmunity**, may 2019.

MENDONÇA, G.A.E.S. *et al.* A situação do câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Câncer**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p.167-176, 01 ago. 1992.

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta

imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.

MIKI, K. *et al.* Regulatory T cells function at the early stage of tumor progression in a mouse model of tongue squamous cell carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 11, p. 1401–1410, 2016.

MONTASTRUC, F. *et al.* Abatacept initiation in rheumatoid arthritis and the risk of cancer: a population-based comparative cohort study. **Rheumatology**, v. 58, n. 4, p. 683–691, 2019.

MOON, S.-M. *et al.* Homeobox C5 expression is associated with the progression of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis: HOXC5 in rat tongue carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 6, p. 470–476, jul. 2012.

MOTZ, G. T.; COUKOS, G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 61–73, 2013.

MUKHERJEE, G. *et al.* Density of CD3+ and CD8+ cells in gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastases and survival. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, 2020.

NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2016.

O’HIGGINS, C.; WARD, F. J.; ABU EID, R. Deciphering the Role of Regulatory CD4 T Cells in Oral and Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 442, 2018.

OKADA, E. *et al.* A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 758, n. 1–2, p. 87–94, 2013.

OSTÖR, A. J. K. Abatacept: a T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 27, n. 11, p. 1343–1353, nov. 2008.

OTANI, K.; KUROSAKA, D. Abatacept suppresses the telomerase activity of

lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, apr. 2019.

PAWLAK, E. *et al.* The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 53, n. 4, p. 336–341, aug. 2005.

PELTANOVA, B.; RAUDENSKA, M.; MASARIK, M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 63, 2019.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 40, n. 9, p. 910–915, 2004.

RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Gingival Changes in Wistar Rats after Oral Treatment with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. **European Journal of Dentistry**, v. 01, n. 03, p. 152–157, 2007.

ROBBINS, S. L. *et al.* Patologia [de] Robbins e Cotran: **bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2016.

ROBERTS, D. *et al.* Comparison of integrated genotoxicity endpoints in rats after acute and subchronic oral doses of 4-nitroquinoline-1-oxide. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 57, n. 1, p. 17–27, 2016.

ROMO-TENA, J.; GÓMEZ-MARTÍN, D.; ALCOCER-VARELA, J. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 12, p. 1171–1176, oct. 2013.

SALTZ, E. Projeto de expansão da prevenção e controle do câncer de boca. **Revista Brasileira de Câncer**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p.221-239, 1 maio 1988.

SCULLY, C.; PORTER, S. ABC of oral health. Oral cancer. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7253, p. 97–100, 8 JUL. 2000.

SILVA, K. *et al.* CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with

- Leishmania spp, **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 470–476, 2013.
- SILVA, P. G. B. *et al.* Immune cell profile of dental pulp tissue treated with zoledronic acid. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 11, p.1067-1076, jan. 2016.
- SIMON, T. A. *et al.* Malignancies in the rheumatoid arthritis Abatacept clinical development programme: an epidemiological assessment. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 12, p. 1819–1826, 2009.
- SINEVICI, N.; O’SULLIVAN, J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncology**, v. 61, p. 12–18, out. 2016.
- SINGEL, K. L.; SEGAL, B. H. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 329–343, 2016.
- SOUZA, A. W. S. *et al.* Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665–679, dez. 2010.
- STUTMAN, O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. **Immunological Reviews**, v. 42, p. 138–184, 1978.
- TANAKA, T.; KAWABATA, K.; SUGIE, S. 4-Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Tongue and Esophagus Carcinogenesis in Obese and Diabetic TSOD Mice. **World Journal of Oncology**, v. 8, n. 4, p. 97–104, 2017.
- TANG, X-H. *et al.* Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 301–313, 2004.
- VASCONCELLOS, M. C. DE *et al.* Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1416–1421, aug. 2007.
- VENKATESH, P. *et al.* Modulation of Doxorubicin-Induced Genotoxicity by Aegle marmelos in Mouse Bone Marrow: A Micronucleus Study. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 1, p. 42–53, 2007.
- VISWANADHA, V. P.; SIVAN, S.; SHENOI, R. Protective effect of Spirulina against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 1, p. 309–

317, 2011.

WADSTRÖM, H. *et al.* Malignant Neoplasms in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Tumor Necrosis Factor Inhibitors, Tocilizumab, Abatacept, or Rituximab in Clinical Practice: A Nationwide Cohort Study From Sweden. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, n. 11, p. 1605, 2017.

WEINBLATT, M. E. *et al.* Safety of Abatacept Administered Intravenously in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Integrated Analyses of up to 8 Years of Treatment from the Abatacept Clinical Trial Program. **The Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 787–797, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pathology & Genetics Head and Neck Tumours**. 5^a ed, Geneva, International Agency for Research on Cancer, 2017.

WU, J. *et al.* Porphyromonas gingivalis Promotes 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Oral Carcinogenesis With an Alteration of Fatty Acid Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2081, 2018.

XU, H. *et al.* The association between immune-related adverse events and the prognosis of solid cancer patients treated with immunotherapy: a systematic review and meta-analysis. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 12, p. 175883592098054, 2020.

XU, X. *et al.* Expression of Th1- Th2- and Th17-associated cytokines in laryngeal carcinoma. **Oncology Letters**, v. 12, n. 3, p. 1941–1948, sep. 2016.

YOSHIJI, S. *et al.* Accelerated Progression of Hepatocellular Carcinoma during Immunosuppressive Therapy with Abatacept for Rheumatoid Arthritis. **Internal Medicine**, v. 58, n. 1, p. 67–71, 2019.

ZHANG, J.; MULLER, J.F.; MCDONALD, A.J. Mu opioid receptor localization in the basolateral amygdala: an ultrastructural analysis. **Neuroscience**, v.303, p. 352–363, 2015.

ZHOU, C. *et al.* Assessment of 5-fluorouracil and 4-nitroquinoline-1-oxide in vivo genotoxicity with P ig-a mutation and micronucleus endpoints: Assessment of 5-FU and

4NQO In Vivo Genotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 9, p. 735–740, 2014.