



Janine Mayra da Silva

**PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CCL3 NA
CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA POR 4-
NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO
EM CAMUNDONGOS**

Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte

2012

Janine Mayra da Silva

**PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CCL3 NA CARCINOGENESE
BUCAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia

Orientadora: Profa. Tarcília Aparecida da Silva

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas – Faculdade Odontologia/UFMG

Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte

2012

**Ao meu bondoso Deus, que tem me capacitado dia após dia e me
abençoado até aqui. Muito obrigada.**

**Aos meus queridos pais, por me ensinarem muito do que sou, pelo
carinho e afeto dedicados, e pela família que construímos.**

**Ao meu grande amor, pela cumplicidade, incentivo e apoio nas
decisões difíceis.**

Agradecimentos

A querida Prof. Tarcília, por me abrir caminhos e oportunidades e pelo aprendizado acumulado.

A Prof.^a Aline e à Universidade Federal de Goiás pela acolhida e pela importantíssima contribuição.

Ao Prof. Mauro Teixeira, por me disponibilizar toda infraestrutura do seu laboratório.

As Profs. Milene Rachid e Débora Negrão-Corrêa pela valiosa colaboração.

Aos professores Maria Auxiliadora, Maria Cássia, Ricardo Gomez, Ricardo Mesquita e Vagner Santos pela competência e pelos conselhos.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A funcionária do laboratório de Patologia Bucal, Inês, pela amizade, companhia e pela competência nos trabalhos realizados.

A todos os meus colegas de trabalho por compartilharem experiências e aprendizados, e, em especial ao meu amigo Celso, pela participação e contribuição em todos os momentos decisivos deste trabalho.

A Alessandra, pela amizade e pela colaboração fundamental no início dos trabalhos.

Aos alunos de iniciação científica, pela grande ajuda na execução dos experimentos.

A todos os meus amigos, pelas palavras de apoio e incentivo, sempre!

AS INDAGAÇÕES

“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

Mário Quintana.

RESUMO

A quimiocina CCL3 possui uma diversidade de funções que podem contribuir para o pior prognóstico do Carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). O objetivo deste estudo foi avaliar o papel de CCL3 em um modelo de carcinogênese bucal induzida pelo 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO). Camundongos machos C57BL/6 (selvagens - *wild type* - WT) e deficientes de CCL3 (CCL3^{-/-}) foram tratados com o 4NQO durante 20 ou 28 semanas na água de beber, na concentração de 50 µg/ml. As línguas foram coletadas para análise macroscópica, histopatológica e imuno-histoquímica. Os níveis de citocinas no tecido lingual foram avaliados por ELISA. Nossos resultados mostraram uma incidência significativamente maior de CCEB nas línguas dos animais selvagens em comparação com os animais CCL3^{-/-}. Consistente com estes achados, a análise microscópica demonstrou uma proeminente displasia epitelial no grupo selvagem. A imunexpressão de PCNA e Ki67 revelou um significativo aumento no índice de proliferação celular nos animais selvagens, comparados ao grupo CCL3^{-/-}. A concentração de CCL3, TNF- α , CCL5 e CCL11 foi significativamente aumentada após o tratamento com 4NQO, entretanto, os animais CCL3^{-/-} mostraram níveis mais baixos de TNF- α quando comparados ao grupo selvagem. Estes dados sugerem que a deleção de CCL3 tem um efeito protetor na carcinogênese oral, o qual pode estar associado com mudanças locais na produção de TNF- α .

ABSTRACT

The chemokine CCL3 displays a diversity of roles that may contribute to worse prognosis in oral carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the role of CCL3 in 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)-induced oral carcinogenesis. C57BL/6 (wild type - WT) and CCL3 deficient (CCL3^{-/-}) male mice were treated with 4NQO in drinking water at concentration of 50 µg/ml during 20 or 28 weeks. Their tongues were collected for macroscopic, histopathological and immunohistochemical analysis. Also, the cytokine levels in tongue lesions were evaluated by ELISA. Our results showed a significantly higher incidence of tumors in tongue of WT- in comparison with CCL3^{-/-}-treated mice. Consistently, microscopic analysis demonstrated a pronounced cytological atypia in the WT-treated group. The immunoexpression of PCNA and Ki67 revealed a significant increase of the proliferative index in WT compared with CCL3^{-/-}-treated group. The concentration of CCL3, TNF- α , CCL5 and CCL11 was significantly enhanced after 4NQO treatment, but CCL3^{-/-}-treated mice showed lower TNF- α level when compared with WT. In conclusion, these data suggest a protective effect of CCL3 deletion in oral tongue carcinogenesis which may be associated with local changes in TNF- α production.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

CCEB: Carcinoma de células escamosas de boca

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

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

CCL5: *CC chemokine ligant 5*, previamente denominada RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*)

CCR1: *CC chemokine receptor 1*

CCR5: *CC chemokine receptor 5*

CEBIO: Centro de Bioterismo

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

DMBA: *7,12-dimetilbenz[a]antracene*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

ELISA: *Enzyme-linked immunoadsorbent assay*

HE: Hematoxilina e eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MPO: Enzima mieloperoxidase

NK: Células *natural killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

TNF- α : *Tumoral necrosis factor-alpha*

Tregs: Células T regulatórias

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WT: *Wild type* (selvagem)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia.

TABELA 2 - Protocolos utilizados na técnica imuno-histoquímica.

SUMÁRIO

1	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	12
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Animais.....	20
3.2	Delineamento Experimental	20
3.3	Análise Microscópica.....	21
3.4	Imuno-histoquímica e contagem das células.....	23
3.5	Ensaio colorimétrico: ELISA e MPO	25
3.6	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Artigo	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6	CONCLUSÕES	57
7	PERSPECTIVAS	58
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	68
	Anexo I - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)	68
	Anexo II - Percentuais dos escores histopatológicos obtidos para os grupos controle e tratados com 4NQO por 20 e 28 semanas	69

1 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

O Carcinoma de Células Escamosas de Boca (CCEB), ou carcinoma espinocelular, é uma neoplasia epitelial maligna que corresponde a cerca de 90-95% de todas as neoplasias da cavidade bucal (BAGAN *et al.*, 2010). Na cavidade bucal, o CCEB afeta principalmente a borda lateral e posterior da língua e o soalho bucal (SCULLY; BAGAN, 2009). Dentre os principais fatores de risco ambientais associados à doença estão o consumo de tabaco e álcool. Juntos, estes fatores estabelecem um sinergismo aumentando o risco de desenvolvimento do CCEB (SCULLY; BAGAN, 2009).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de incidência para o ano de 2012 em homens e mulheres no Brasil é de 14.170 novos casos, aproximadamente. Nos últimos anos, houve um aumento significativo na incidência da doença entre pacientes jovens, que tem sido relacionado principalmente à mudança no padrão de hábitos e estilos de vida (SCULLY; BAGAN, 2009; SILVERMAN, 2001).

O CCEB é uma neoplasia que possui alto grau de invasão local e altas taxas de metástase, o que afeta diretamente o prognóstico dos pacientes (BATISTA *et al.*, 2010; MASSANO *et al.*, 2006; SHANG *et al.*, 2009). Com relação a disponibilidade de alternativas de tratamento do CCEB como cirurgia, radiação e quimioterapia ou uma combinação destes, a sobrevida dos pacientes não tem mudado significativamente nas últimas décadas (NEVILLE; DAY, 2002). A escassez de biomarcadores de prognóstico, aliado ao diagnóstico tardio são os principais fatores responsáveis por este panorama. Por isto, o desenvolvimento de novos parâmetros moleculares para o CCEB tem sido uma importante prioridade em pesquisa. Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese bucal pode proporcionar meios de prevenção e detecção precoce do CCEB (LEE *et al.*, 2000). Deste modo, a utilização de modelos

experimentais de carcinogênese bucal em animais é uma ferramenta importante no auxílio do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer de boca.

A carcinogênese é um processo complexo que resulta do acúmulo de inúmeros eventos genéticos e epigenéticos que desregulam as vias que regem a divisão, diferenciação e morte celular (WILLIAMS, 2000). Em suma, a iniciação, promoção e progressão são três eventos essenciais na carcinogênese. A iniciação é a etapa em que os carcinógenos danificam permanentemente o DNA da célula. Se os mecanismos de reparo do DNA fracassarem esta célula mutada replica-se ampliando as alterações adquiridas (FONSECA, 2003; WILLIAMS, 2000). A promoção caracteriza-se pela conversão de uma célula iniciada em uma com características tumorais, através de agentes promotores. Finalmente, a progressão é o termo designado para descrever o processo pelo qual um neoplasma é desenvolvido por uma ou mais alterações irreversíveis, qualitativas em suas células constituintes (BOYD; READE, 1988). Assim, a proliferação celular é uma importante etapa no desenvolvimento do tumor. De fato, alguns estudos experimentais utilizando o modelo com o 4NQO têm mostrado significativo aumento nos índices de proliferação celular no tecido epitelial (FARIA, 2006; FONSECA *et al.*, 2003; VERED *et al.*, 2007). Interessante é que as múltiplas alterações provocadas pelo 4NQO são geradas precocemente e estão associadas com o desenvolvimento de clones persistentes de células epiteliais com o DNA danificado (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Existem muitos modelos animais que podem ser utilizados para a indução de carcinoma de células escamosas na cavidade oral de roedores (incluindo hamster, ratos, e camundongos) (DERKA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2004; SCHOOP *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2004). Dentre os modelos conhecidos, destacam-se os que utilizam os carcinógenos químicos 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) e o 4-nitroquinolina-1-

óxido (4NQO) (KANOJIA; VAIDYA, 2006; LU *et al.*, 2006; MINICUCCI *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2004). O modelo com o DMBA é mais comumente utilizado para induzir lesões na mucosa da bochecha de hamsters Sírios, após repetidas aplicações por várias semanas (DERKA *et al.*, 2006). Entretanto, o DMBA, bem como seu solvente, é um potente irritante local, que causa uma significativa resposta inflamatória e necrose dificultando a distinção entre transformações neoplásicas verdadeiras e reatividade celular de origem inflamatória (KANOJIA; VAIDYA, 2006).

O 4-NQO e seus metabólitos induzem um intenso estresse oxidativo intracelular com geração de espécies reativas de oxigênio como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio que danificam o material genético (KANOJIA; VAIDYA, 2006; NUNOSHIBA; DEMPTE, 1993; RIBEIRO, *et al.*, 2004). O 4NQO é um derivado das quinolonas e sua ação carcinogênica inicia-se com a redução enzimática do seu grupo nitro, formando um composto chamado 4-hidroxiaminoquinolina-1-óxido (4HAQO). Este produto metabólico intermediário liga-se preferencialmente a resíduos de guanina, sendo responsável pela formação de adutos de DNA (KANOJIA; VAIDYA, 2006).

O 4-NQO é o carcinógeno de escolha por muitos por suas propriedades como solubilidade, indução de tumores particularmente em língua e esôfago, e por causar dano ao DNA de modo similar ao provocado pelo tabaco (KANOJIA; VAIDYA, 2006; LU *et al.*, 2006). Além disso, o 4-NQO induz a sequência de estágios observada na carcinogênese, produzindo desta forma, mudanças morfológicas e moleculares, de forma semelhante àquelas observadas na carcinogênese oral em humanos (KANOJIA; VAIDYA, 2006; NAUTA, *et al.*, 1996; TANG, *et al.*, 2004).

Com relação ao método de aplicação do 4-NQO, obtêm-se melhores resultados quando o carcinógeno é dissolvido na água de beber dos animais (LU *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2004). Além disso, Tang *et al.* (2004), estudando comparativamente a

incidência de tumores em camundongos que receberam o 4-NQO diluído em água ou pincelado na língua, verificaram que ao final do experimento de 28 semanas, 100% dos animais que receberam a droga diluída em água desenvolveram tumores, enquanto apenas 5% desenvolveram tumores quando a técnica de pincelamento foi empregada (TANG *et al.*, 2004).

Estudos prévios têm mostrado a presença de um infiltrado imune/inflamatório peritumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUNSESS; WERB, 2002; HANAHAN, *et al.*, 2003). Muitos tumores sólidos não são apenas massas de células neoplásicas (parênquima), são também compostos por células não-malignas (estroma) (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Macrófagos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos, eosinófilos, granulócitos, células *natural killer* (NK) e células B são algumas populações encontradas no estroma de alguns tumores (COUNSESS; WERB, 2002).

No CCEB, por exemplo, tem sido demonstrada a presença de células T regulatórias (*Tregs*), *natural killers* (NK), células dendríticas e macrófagos (FERREIRA *et al.*, 2008; GASPAROTO *et al.*, 2010; ZANCOPE *et al.*, 2010). O recrutamento destas células para o microambiente tumoral é mediado por quimiocinas, que são proteínas de pequeno peso molecular envolvidas na migração direcionada de leucócitos, mediante um gradiente químico (BAGGIOLINI, 1998; BALKWILL, 2004). Além disso, as próprias células neoplásicas podem ser fonte de quimiocinas, as quais podem participar no processo de metástase e conseqüentemente no agravamento do câncer (BALKWILL, 2004; LU *et al.*, 2003). Diversas quimiocinas possuem relação com o desenvolvimento e crescimento tumoral, dentre elas, as quimiocinas CCL11, CCL5, TNF- α e CCL3 merecem uma abordagem no CCEB.

A quimiocina CCL11 (também chamada Eotaxina) é constitutivamente expressa em uma diversidade de tecidos, como intestino, pele, coração e nodos linfáticos (SALCEDO, *et al.*, 2001). Seus efeitos biológicos se dão através da ligação primária ao seu receptor CCR3, que é expresso em basófilos, linfócitos Th2, e principalmente, em eosinófilos. Um papel importante de CCL11 tem sido mostrado em doenças inflamatórias crônicas (SALCEDO *et al.*, 2001), no câncer ovariano (NOLEN; LOKSHIN, 2010), e também no CCEB (LORENA *et al.*, 2003). De fato, já foi observado um aumento na expressão de CCL11 e aumento no número de eosinófilos no CCEB (LORENA *et al.*, 2003). Entretanto, seu papel no CCEB ainda necessita ser mais bem investigado. Alguns autores sugerem que CCL11 pode contribuir para a angiogênese em condições caracterizadas por aumento na sua produção e infiltração de eosinófilos, como no Linfoma de Hodgkin, polipose nasal, endometriose e diateses alérgicas (SALCEDO *et al.*, 2001).

A expressão da quimiocina CCL5 (previamente chamada RANTES) também tem sido detectada em vários tipos de tumores, como mama, linfoma e próstata (SORIA; BEN-BARUCH, 2008; ALDINUCCI, *et al.*, 2008; VADAY, *et al.*, 2006). No câncer de mama, tem sido bem documentado que uma alta expressão de CCL5 está associada com a progressão da doença, e o desenvolvimento de metástases (SORIA; BEN-BARUCH, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que as células neoplásicas são capazes de secretar CCL5, que geralmente se correlaciona com um aumento na infiltração de macrófagos (KARNOUB; WEINBERG, 2006-2007). Em um recente estudo, Weng *et al.*, (2010) sugeriram uma possível relação de polimorfismos nos genes de CCL5 e seu receptor CCR5, e o risco aumentado de desenvolvimento de CCEB, entretanto, mais estudos são necessários (WENG, *et al.*, 2010).

Outro importante mediador que está envolvido na inflamação e desenvolvimento de tumores é o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). O TNF- α é uma citocina que participa de processos inflamatórios, manutenção e homeostase do sistema imune do hospedeiro e, também, na promoção e progressão do câncer (BALKWILL, 2006). Estudos experimentais em animais têm mostrado que a participação de TNF- α é essencial para o desenvolvimento de tumores em pele de camundongos geneticamente deficientes para esta citocina (SUGANUMA *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 1999). Além disso, a deleção de ambos os receptores de TNF- α (TNFR1 e TNFR2) em modelo de indução química de carcinogênese em pele de camundongos, também foi capaz de reduzir drasticamente a formação de tumores nos animais *knockout* em relação aos selvagens (ARNOTT *et al.*, 2004).

A expressão/participação da quimiocina *Macrophage inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1 α), renomeada CCL3, tem sido observada em diversos tipos de tumores (LU *et al.*, 2003; NATH *et al.*, 2006; TERPOS *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2006), inclusive no CCEB (SILVA *et al.*, 2007). Estudos prévios conduzidos pelo nosso grupo demonstraram elevada expressão de CCL3 e CCR1 em amostras de CCEB primário, e em linfonodos metastáticos em relação aos respectivos controles. Em geral, um aumento na expressão de CCL3 tem sido associado a um prognóstico desfavorável por parte do hospedeiro contra o câncer (LU *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2008). Lu e colaboradores (2003) demonstraram que CCL3 e seu receptor CCR1 estavam expressos de forma aberrante em espécimes de hepatoma humano, e, três anos mais tarde, o mesmo grupo demonstrou uma contribuição importante do eixo CCL3-CCR1 na progressão da doença utilizando um modelo murino de hepatocarcinogênese induzida (YANG *et al.*, 2006). Em suma, foi sugerida a participação desta quimiocina no recrutamento de leucócitos para o sítio tumoral, o que indiretamente poderia

estimular a liberação de fatores angiogênicos, e conseqüentemente, contribuir para a progressão tumoral. Além disso, Wu e colaboradores (2008) demonstraram a contribuição de CCL3 e CCR5 (outro receptor de CCL3), no processo de metástase pulmonar induzida por células de carcinoma renal, também regulando a migração de leucócitos e induzindo neovascularização e metástase. Um elevado percentual de células tumorais CCL3⁺ também já foi associado com pior prognóstico no CCEB (SILVA *et al.*, 2007).

Entretanto, um papel oposto para CCL3, no qual sugere-se participação de CCL3 na resposta antitumoral do hospedeiro no carcinoma de mama (NATH *et al.*, 2006) e de boca (SILVA *et al.*, 2007) tem sido sugerido. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que células tumorais transfectadas com o gene CCL3 apresentaram tumorigenicidade reduzida, e foram capazes de induzir imunidade antitumor (NAKASHIMA *et al.*, 1996).

Portanto, o papel da quimiocina CCL3 no CCEB ainda precisa ser esclarecido. Nossa hipótese é que os animais deficientes para CCL3 possuam menor incidência de tumores, bem como menor severidade das lesões e índice proliferativo. Além disso, **espera-se** um aumento na expressão das quimiocinas CCL3, CCL11, CCL5 e de TNF- α com a progressão das lesões de CCEB.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar o efeito do 4NQO na indução de tumores linguais em camundongos;
2. Avaliar a participação de CCL3 no modelo de carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (selvagens – *wild type* – WT) e camundongos deficientes de CCL3 (CCL3^{-/-}), provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação e temperatura, dieta padrão para camundongo e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG), protocolo nº 12/2011 (ANEXO I). Os animais foram pesados semanalmente e nenhuma alteração foi observada durante o período experimental.

3.2 Delineamento Experimental

No presente estudo, o modelo experimental de indução de carcinogênese em língua foi realizado como previamente descrito por Tang *et al.* (2004). Uma alíquota de 1 g de 4NQO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvida em 200 ml de etilenoglicol (Sigma) e estocada a 4°C. Semanalmente, alíquotas foram diluídas na água de beber dos animais (concentração final de 50 µg/ml). As garrafas de polivinil foram protegidas da luz ambiente.

Os camundongos do grupo experimental (4NQO) receberam o tratamento com o carcinógeno diariamente durante 20 ou 28 semanas. Os animais do grupo controle receberam água filtrada sem 4NQO. A média de ingestão de água com ou sem 4NQO, por gaiola foi registrada ao longo do período experimental e não houve diferença entre

os grupos. Após um período de 20 ou 28 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina (100 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente) via intraperitoneal.

Em seguida, foi realizada a eutanásia dos animais e coletados os seguintes órgãos/tecidos: língua, linfonodos cervicais, fígado, estômago, duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso para análise microscópica. Após a coleta das línguas, as mesmas foram identificadas e fotografadas para análise macroscópica. À exceção das línguas, o restante dos órgãos/tecidos foi coletado para verificação da ocorrência ou não de metástases à distância ou qualquer alteração que o tratamento com o 4NQO pudesse provocar.

A análise histopatológica dos linfonodos cervicais não mostrou sinais de alteração em comparação aos respectivos controles. Entretanto, a análise dos fígados dos animais WT e CCL3^{-/-} tratados por 28 semanas mostrou graus variáveis (branda, moderada e intensa) de tumefação, esteatose e hemorragia em comparação aos controles. Os tecidos estomacais e intestinais dos animais tratados também mostraram graus variados de hiperqueratose, hiperplasia e inflamação, em relação aos controles. A presença de carcinoma ou metástase em órgãos distantes não foi observada em nenhum dos grupos.

3.3 Análise Microscópica

Todos os tecidos coletados citados previamente foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, e processados por técnicas de rotina. As línguas foram cortadas no sentido ântero-posterior, e as metades incluídas segundo a orientação da secção desejada. Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos para coloração com

hematoxilina e eosina (HE). Para gradação da displasia epitelial nas línguas, critérios de alterações na arquitetura e na citologia foram levados em conta, conforme descritos na (TAB. 1).

As lesões em língua foram então classificadas empregando-se escores histopatológicos, de acordo com os critérios adaptados da OMS (2005), a qual enumera as lesões como “hiperplasia escamosa”, “displasia leve”, “displasia moderada”, “displasia severa” e “carcinoma *in situ*”.

Neste estudo, optou-se pela seguinte classificação:

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

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

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

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

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

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

A análise microscópica consistiu na observação de 5 campos consecutivos, representativos da alteração displásica, iniciando-se pelo campo com maior severidade, em 2 cortes. A avaliação foi executada por dois examinadores cegados diante do *status* dos grupos. O anexo II mostra em detalhes os percentuais obtidos para todos os escores histopatológicos obtidos para os grupos controle e tratados com 4NQO por 20 e 28 semanas (ANEXO II).

TABELA 1 – Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia.

Arquitetura	Citologia
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho nuclear
Perda de polarização das células basais	Variação anormal na forma nuclear
Cristas epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho e forma da célula
Aumento do número de figuras de mitose	Aumento na proporção núcleo –citoplasma
Mitoses superficiais atípicas	Figuras de mitose atípicas
Queratinização prematura de células	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Pérolas de queratina	Hiperchromatismo

Fonte: Organização Mundial de Saúde – OMS (2005).

3.4 Imuno-histoquímica e contagem das células

Secções das línguas (3 μ m) foram submetidas a reações de imuno-histoquímica utilizando o método da estreptavidina-biotina. As amostras foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em água destilada. Então, foram incubadas com dois banhos de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada seguindo-se protocolos específicos para cada anticorpo primário utilizado (TAB. 2).

TABELA 2 – *Protocolos utilizados na técnica imuno-histoquímica.*

Anticorpo	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
PCNA ^a	124	Ácido cítrico 10mM, pH=6 durante 20 minutos em banho-maria a 96°C	1:800	Overnight 4°C
Ki67 ^b	MM1	Ácido cítrico 10mM, pH=6 durante 3 ciclos de 5 minutos cada em microondas na potência 9	1:50	Overnight 4°C

^a Dako, Glostrup, Denmark

^b Novocastra, Newcastle, UK

Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário Multi-Link (sistema LSAB/HRP, Dako) segundo as instruções do fabricante. A reação foi revelada através da incubação com solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Dako), durante 1 minuto. Finalmente, os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer, desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com Permount (Fisher Scientific). Controles negativos foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário, os quais foram substituídos por PBS-BSA a 1%.

As células imunomarcadas foram analisadas por microscopia de luz (Axioskop 40 ZEISS; Carl Zies, Gotingen, Germany), no aumento de 100x e contadas nas camadas epiteliais, numa área total de 20 campos consecutivos, em dois cortes. Um índice total de células PCNA⁺ e Ki67⁺ foi obtido somando-se todos os resultados de todas as camadas epiteliais.

3.5 Ensaios colorimétricos: ELISA e MPO

Amostras de tecido lingual foram também coletadas para ensaios imunoenzimáticos. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em solução salina fosfato [(0.4 mM NaCl e 10 mM NaPO₄, pH4.7) contendo inibidores de protease (0.1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA, e 0.01 mg/mL aprotinina A) e 0.05% Tween-20] na concentração final de 100 mg/mL. O homogenato foi então centrifugado (10.000 r.p.m) a 4°C for 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a -70°C para análise posterior. A concentração de CCL3, CCL5, CCL11 e TNF- α foi mensurada utilizando-se kits disponíveis no mercado, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em picogramas por 100 mg de tecido.

O acúmulo de leucócitos nas lesões de carcinoma, especificamente neutrófilos, foi analisado indiretamente pelo ensaio de atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) conforme previamente descrito (QUEIROZ-JÚNIOR *et al.*, 2009). Fragmentos de tecido lingual foram coletados e congelados em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA; pH 4,7) (1g de tecido em 19 mL de tampão) e centrifugado à 10.000 r.p.m por 10 min. Procedeu-se, então, lise hipotônica do precipitado adicionando-se 15 mL/g tecido de solução de NaCl 0,2% seguido da mesma quantidade de NaCl 1,6% Glicose 5%. Após centrifugação o precipitado foi então suspenso em tampão 0,05 M NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado. Alíquotas da suspensão sofreram 3 ciclos de congelamentos e descongelamentos em nitrogênio líquido. Estes foram novamente centrifugados por 15

min a 10.000 r.p.m. A atividade MPO foi medida no sobrenadante por mudanças da densidade óptica a 450 nm usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram expressos como unidades relativas com base na absorbância obtida.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM (erro-padrão da média). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 4.0. O teste *t* de Student ou a Análise de Variância (ANOVA) foram utilizados para comparar dois ou mais grupos experimentais, respectivamente. No caso de observação de significância estatística no teste ANOVA, será realizado pós-teste *Student-Newman-Keuls*. O nível de significância estatística será estabelecido em $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados e discussão do presente estudo será feita no formato de artigo científico a ser submetido para publicação.

4.1 Artigo

CCL3 deletion protects mice against oral squamous carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide

Janine Mayra da Silva¹, Aline Carvalho Batista², Déborah Aparecida Negrão-Correa³,
Milene Alvarenga Rachid⁴, Mauro Martins Teixeira⁵, Remo de Castro Russo⁵, Tarcília
Aparecida da Silva¹¹

¹Department of Oral Surgery and Pathology, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

²Department of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil;

³Department of Parasitology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴Department of General Pathology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁵Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

¹ Reprint requests to: Tarcília Aparecida da Silva Mailing address: Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail: tarcilia@ufmg.br

ABSTRACT

The chemokine CCL3 displays a diversity of roles that may contribute to worse prognosis in oral carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the role of CCL3 in 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)-induced oral carcinogenesis. C57BL/6 (WT) and CCL3 deficient mice (CCL3^{-/-}) male mice were treated with 4NQO during 20 or 28 weeks by drinking water, concentration of 50 µg/ml. The tongues were collected for macroscopic, histopathological and immunohistochemical analysis. Also, the cytokine levels in tongue lesions were evaluated by ELISA. Our results showed a significantly higher incidence of tumors in tongue of WT- in comparison with CCL3^{-/-}-treated mice. Consistently, microscopic analysis demonstrated a pronounced cytological atypia in the WT-treated group. The immunoexpression of PCNA and Ki67 revealed a significant increase of the proliferative index in WT compared with CCL3^{-/-}-treated group. The concentration of CCL3, TNF-α, CCL5 and CCL11 was significantly enhanced after 4NQO treatment, but CCL3^{-/-}-treated mice showed lower TNF-α level when compared with WT. In conclusion, these data suggest a protective effect of CCL3 deletion in oral tongue carcinogenesis which may be associated with local changes in TNF-α production.

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is characterized by a high degree of local invasion and a high rate of metastasis to the cervical lymph nodes, which directly affects the prognosis of the patients¹⁻³.

To better understand the molecular mechanisms of carcinogenesis in OSCC, animal models are needed. The most commonly used models for experimental oral carcinogenesis are the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced in hamster cheek pouch and the 4-nitroquinoline-1 oxide (4NQO)-induced in tongue of rats and mice. 4NQO is given to mice by local painting or in the drinking water, for 2-6 months^{4,5}. The incidences of tumor formation are higher when 4NQO is dissolved in drinking water^{4,5}. The DNA damage caused for 4NQO is similar to carcinogens present in tobacco, which is the most important risk factor for OSCC⁴⁻⁷.

The role of peritumoral inflammatory cell infiltrate in OSCC development has been demonstrated^{1,8-10}. The recruitment of these immune infiltrate is regulated by chemokines, which are a large family of small structurally related heparin-binding proteins that have been identified as attractants of leukocytes to sites of inflammation¹¹. Although originally identified on leukocytes, functional chemokines and chemokine receptors are also found on neoplastic cells and on tumor-associated stromal cells¹⁰⁻¹⁴.

In previous studies conducted by our group, we observed an augmented expression of the chemokine CCL3 in samples of human OSCC and an increase of CCL3-positive cells in metastatic lymph nodes. Elevated CCL3 positivity in neoplastic cells was associated with worse OSCC prognosis¹². In line with this, an overexpression of CCL3^{15,16} and its receptor CCR1¹⁵ was observed in different types of tumors. In hepatocellular carcinoma, CCL3 and CCR1 overexpression was related to tumor

progression¹⁷. Furthermore, in a mice model of lung metastasis induced by renal cell carcinoma the axis CCL3-CCR5 was demonstrated to regulate intratumoral trafficking of inflammatory cells and also neovascularization and metastasis¹⁸.

These aspects prompted us to evaluate the effect of CCL3 deletion in a mice model of 4NQO-induced oral carcinogenesis to provide a better understanding of CCL3 role in OSCC development.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6 (WT) and CCL3 deficient mice (CCL3^{-/-}) were obtained from Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO), Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Mice were maintained under standard conditions with a 12 h light/dark cycle, controlled temperature (24 ± 2°C) and had free access to commercial chow and drinking water. All experimental procedures described in the current study were approved by the institutional Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG – protocol nº 12/2011). The animals were weighed weekly and no changes were observed during the experimental period.

Experimental design

In the present study, the experimental model of oral tongue carcinogenesis was performed as previously described⁵. Briefly, 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO), obtained as a powder (Sigma, St. Louis, MO, USA), was dissolved in ethylene glycol (Sigma) to a final concentration of 50 µg/ml and stored at 4°C. The stock solution was prepared weekly and diluted in the drinking water.

Experimental mice received treatment with 4NQO daily during 20 or 28 weeks. Control mice received drinking water without 4NQO. The mean intake of water was recorded, but there was no difference between the groups. After the 20 or 28 weeks of carcinogen treatment, mice were euthanized and tongue, cervical lymph nodes, liver, stomach, duodenum, jejunum, ileum and large intestine were collected for microscopic analysis.

Light microscopy

Tongue, cervical lymph nodes, liver, stomach, duodenum, jejunum, ileum and large intestine tissues were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin wax and longitudinally cut (3 μ m sections). The slides were deparaffinized, rehydrated, and stained with H&E. The tongue lesions were classified using the scores [adapted from reference 19]¹⁹: 0 - normal, 1 - mild dysplasia (changes limited at basal third of the lining epithelium), 2 - moderate (when the changes represented two-thirds of the lining epithelium), 3 - severe (more than two-thirds of the epithelium affected), 4 - carcinoma in situ (full thickness of the lining epithelium, but without involvement of the connective tissue) and 5 - invasive carcinoma (carcinomatous islands into the connective tissue). For microscopic analysis 5 consecutive fields were evaluated by two examiners blinded of the group status.

Immunohistochemistry and cell counting

Immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin method. Briefly, serial sections of tongue tumors were deparaffinized, dehydrated and rinsed in distilled water. Then, they were incubated with 0.3% hydrogen peroxide twice for 15 min. For antigen retrieval, the slides were incubated in citric acid buffer (pH=6.0) at 96°C for 20 min. The slides were incubated at 4°C overnight with one of the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-human PCNA (clone 124; Dako, Glostrup, Denmark) at 1:800 and monoclonal mouse anti-human Ki-67 (clone MM1; Novocastra, Newcastle, UK) at 1:50. The immunolabeling was visualized through incubation in 3,3-diaminobenzidine (DAB) solution (Dako). Finally, the sections were stained with Mayer's hematoxylin and covered. Negative controls were obtained by omission of the primary antibodies, which were substituted by 1% PBS-BSA.

The immunostained cells were analyzed by light microscope (Axioskop 40 ZEISS; Carl Zeiss, Gottingen, Germany) at 100x magnification and counted in the epithelial layers in the total area of 20 consecutive fields in two sections. A total index of PCNA and Ki67 positive cells was obtained adding the results of all epithelial layers.

ELISA and MPO

Tongue lesional samples were also collected for immunoenzymatic assays. The samples were weighed and homogenized in phosphate buffered saline (0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO₄) containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 0.01 mg/mL aprotinin A) and 0.05% Tween-20 at 100 mg/mL. The homogenate was centrifuged (10.000 r.p.m) at 4°C for 10 min. The supernatant was then collected and stored at -70°C until further analysis. The concentration of CCL3, CCL5, CCL11 and TNF- α was measured using commercially available kits, according to manufacturer instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed as picograms of cytokines (\pm S.E.M.) normalized for 100 mg tissue.

The MPO activity, a neutrophil enzyme marker, was evaluated in homogenized tongue tissues by enzymatic reaction, as previously described²⁰. The MPO contents were expressed as relative units calculated from standard curves based on the MPO activity from 5% casein peritoneal-induced neutrophils.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 4.0. The non-parametric unpaired Student *t* test was performed and statistical significance was achieved when P values were <0.005.

RESULTS

The concentration of CCL3 in the tongue of control and group treated with 4NQO for 28 weeks is shown in Figure 1. A significant increase of CCL3 was observed in 4NQO-treated group ($p<0.05$).

The macroscopic analysis of the tongue lesions demonstrated a significantly higher production of tumors in WT-treated mice (Fig. 2B) in comparison with CCL3^{-/-}-treated mice (Fig. 2D). No changes on tongue surface were observed in the control groups (Fig. 2A and 2C).

Consistent with the macroscopic findings, the microscopic analysis showed that WT-treated mice exhibited pronounced cytological atypia, with 100% of lesions graduated as carcinoma in situ and invasive carcinoma (scores 4 and 5, respectively). In contrast, the lesions of CCL3^{-/-}-treated group presented lower grade of cellular atypia and severity, with 57% of the lesions graduated as moderate and severe dysplasia (scores 2 and 3, respectively) (Figs. 3 and 4). The histological score confirmed significant changes in epithelium of WT compared with CCL3^{-/-} mice after 20 and 28 weeks of 4NQO treatment ($p<0.05$) (Fig. 4). No abnormality in the epithelium architecture was observed in control groups (Fig. 3 A-D and Fig. 4).

The immunoexpression of the proliferative markers revealed a significant increase of PCNA and Ki67-positive cells after 28 weeks of 4NQO-treatment in both groups when compared to respective controls (Figs. 5 and 6). WT mice exhibited a significantly increased of proliferative index when compared with CCL3^{-/-} (Figs. 5 and 6).

There were no differences for MPO activity comparing the experimental (0.042±0.007 and 0.047±0.004 relative units, respectively WT- and CCL3^{-/-}-treated mice) and control groups (0.046±0.005 and 0.039±0.005, respectively WT and CCL3^{-/-}).

The concentrations of TNF- α , CCL5 and CCL11 in the tongue samples were significantly augmented in WT-treated mice when compared to the control group ($p<0.05$). Moreover, CCL3^{-/-}-treated mice showed lower TNF- α levels when compared with WT-treated mice ($p<0.05$). Significant changes between treated groups were not detected when analyzing the chemokines CCL5 and CCL11 (Fig. 7).

The histopathological analysis of cervical lymph nodes and the other organs revealed no occurrence of metastasis. However, the liver samples of treated mice presented variable degrees of hepatocyte tumefaction, steatosis and hemorrhage. The stomach and intestine samples also presented variable degrees of hyperkeratosis, hyperplasia and inflammation.

DISCUSSION

The involvement of inflammatory mediators, such as chemokines, in OSCC development has been suggested^{10,12,14,21}. Some chemokines, such as CCL2, CCL3 and CXCL12, were already associated with metastasis process and worse prognosis of OSCC^{10,12,14}. In the current study, an experimental model of OSCC was used to investigate the influence of the chemokine CCL3 in this malignancy. Our major findings can be summarized as follows: (i) there was a significant induction of tumors in the tongue of WT mice, compared to CCL3 deficient mice and controls; (ii) these results were confirmed by histopathological analysis and index of neoplastic cell proliferation; (iii) CCL3-treated mice showed lower concentration of TNF- α in tongue lesions than WT-treated mice.

Animal models are useful because they allow the reproducible isolation of all stages of carcinogenesis⁷. Here we used the 4NQO to induce squamous cell carcinoma in tongue in mice. We observed a significant induction of tumors in tongue of treated mice demonstrating that 4NQO was able to induce histopathological changes during the course of the experiment. The patterns of PCNA and Ki67 expression confirmed these results. The advantages of employing this carcinogen are solubility, easiness of administration, the DNA damage is similar to effects produced by tobacco carcinogens and it induce lesions preferably in tongue and esophagus^{4,5,7}. The induced tongue lesions are well located with minimal infiltrating cells²². There was no documented occurrence of lymph nodes metastasis in this model. In fact we did not find a detectable amount MPO activity, and inflammatory cells in tumor stroma, as well as, no occurrence of metastasis to the cervical lymph nodes and other organs.

The increase of CCL3 expression in tongue carcinomas induced by 4NQO may be indicative for a role of this molecule in oral carcinogenesis. The CCL3 chemokine plays a crucial role in the recruitment of leucocytes into inflammatory sites²³. Furthermore, CCL3 is important for intratumoral accumulation of mononuclear cells as granulocytes, macrophages and fibroblasts^{17,18}. Indeed, CCL3 is augmented in different types of tumors^{15,17,24-27}, including OSCC¹².

The effect of CCL3 and CCR1 deletion was previously demonstrated in other types of tumors^{17,18}. Here, we observed a reduced tongue tumors formation in absence of CCL3. In accordance, CCL3 and CCR1 deficient mice had significantly reduced incidence of tumors in chemical carcinogen-induced hepatocarcinogenesis¹⁷. Furthermore, CCL3 and CCL5 deficiency resulted in significantly reduced lung metastasis induced by renal cell carcinoma¹⁸. In line with this, we previously observed an augmented CCL3 expression in OSCC neoplastic cells and metastatic lymph nodes, which were associated with worse prognosis¹². On the other hand, a high percentage of CCL3⁺ cells in tumoral stroma (of these same samples) was associated with better mean survival rate¹². A previous study showed that CCL3 was involved in the host defense against breast cancer²⁵. Moreover, some studies showed that adenocarcinoma cells transfected with the CCL3 gene had reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice²⁸. These differences can be explained by distinct experimental approaches, type of tumors and parameters analyzed. Taken together, the results might suggest that CCL3 have a role in the spread of tumoral cells and in the host defense against tumor. These apparently paradoxical roles deserve further investigation.

We also observed an increase of TNF- α , CCL5 and CCL11 production associated with 4NQO treatment. It can indicate a possible role of these mediators in the

4NQO-induced carcinogenesis. CCL11 has an important role in cancer because it is a powerful eosinophil chemoattractant²⁹. CCL5 expression has also been detected in many types of cancer^{30,31} and its relationship with breast cancer metastasis was shown³². Furthermore, CCL5 and CCR5 genes polymorphisms were correlated with increased risk of OSCC development³³. We verified a diminished local TNF- α production in CCL3 deficient mice. These reduced levels might account for the protective effect in tongue carcinogenesis observed in the absence of CCL3. TNF- α is the one of the key cytokines related to inflammation-associated cancers and strong evidences show that this mediator is involved in early stages of carcinogenesis in murine models³⁴. In a mouse model of skin carcinogenesis, TNF- α deficient mice were resistant to DMBA/TPA-treatment³⁵. Similar results were shown by Suganuma et al. (1999)³⁶. Also, the depletion of TNF- α receptors (TNFR1 and TNFR2) was able to reduce the susceptibility of mice to skin carcinogenesis³⁷. Interestingly, the release of TNF- α from endothelial cells and tissue macrophages is able to induce the CCL3 production from stromal and tumoral cells²⁵.

In conclusion, our findings provide evidence of the CCL3 contribution in the oral carcinogenesis induced by 4NQO. The mechanisms by which CCL3 affects oral tumorigenesis (if activation of specific inflammatory pathways with selective recruitment of inflammatory/immune cells population; induction of angiogenesis; stimulation of tumor growth and spreading or others) need further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support.

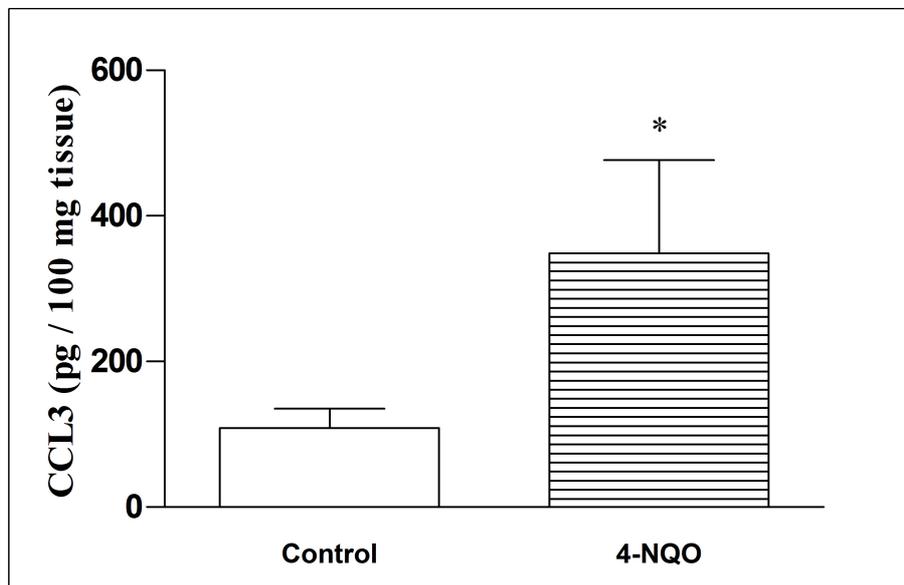


FIGURE 1 – Increase of CCL3 concentration in tongues of 4NQO-treated mice (C57BL/6) after 28 weeks. * $p < 0.05$ in relation to control.

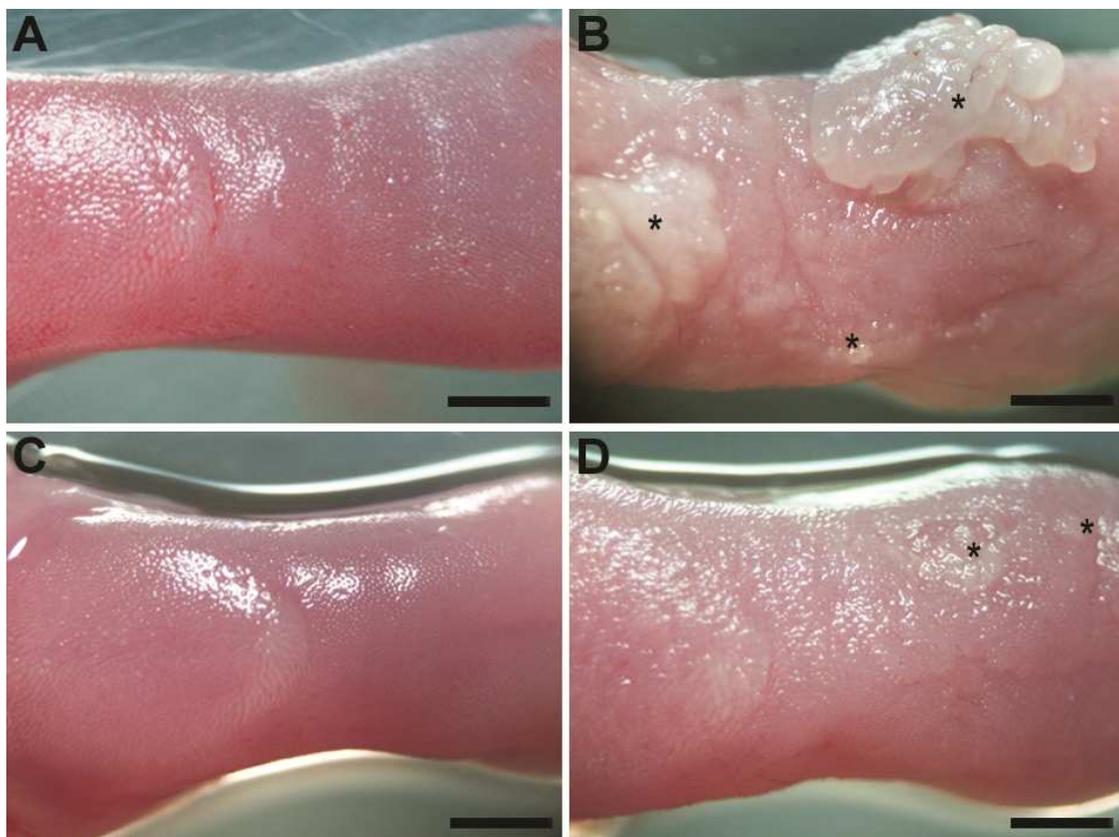


FIGURE 2 – Macroscopic aspect of tongues from control and experimental C57BL/6 and CCL3^{-/-} mice. No morphological changes were seen in C57BL/6 (A) and CCL3^{-/-} (C) control mice. The asterisks indicates the clinical features of induced lesions in C57BL/6 (B) and CCL3^{-/-} (D)-treated mice after 28 weeks with 4NQO (Barr = 0.1 cm).

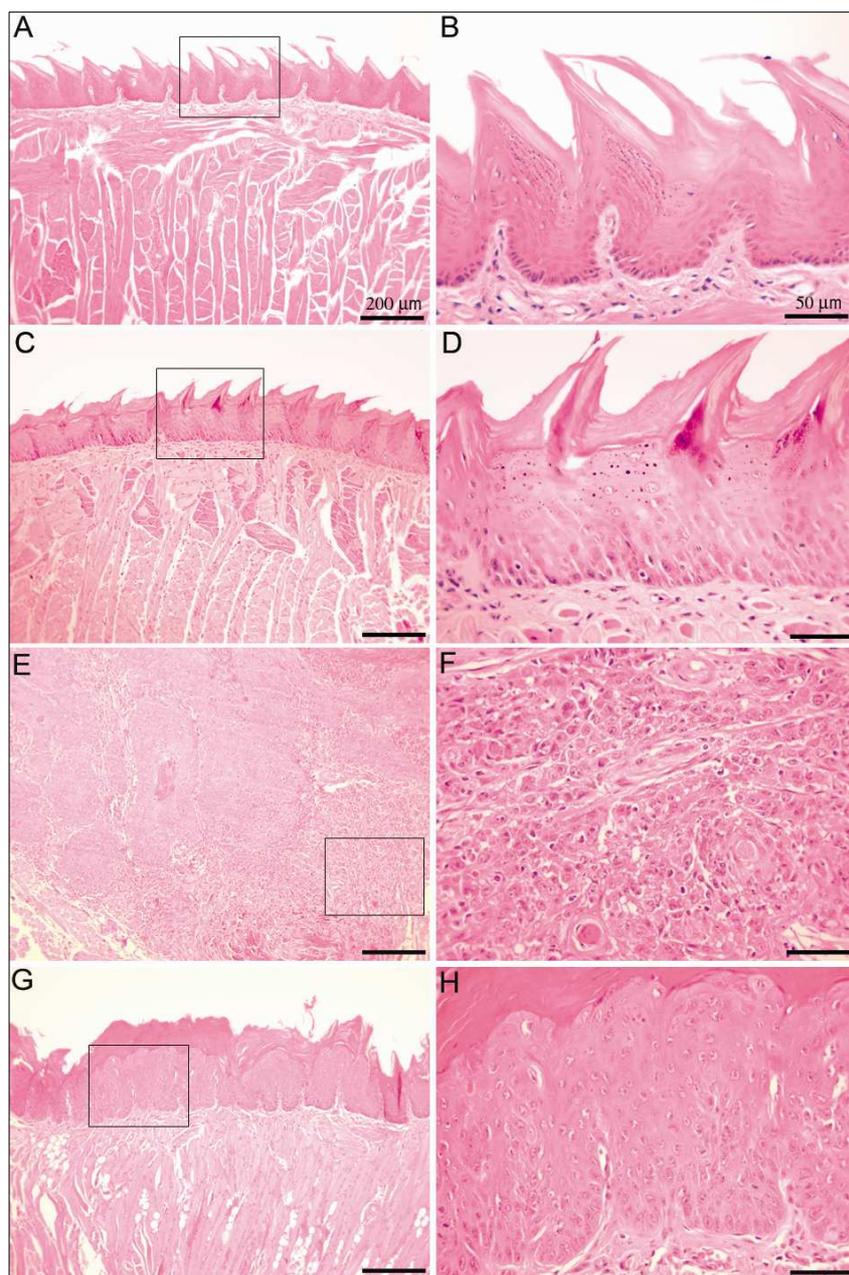


FIGURE 3 – Representative histopathological images of the tongues of control and experimental mice. A-B (C57BL/6) and C-D (CCL3^{-/-}) indicate control mice. E-F (C57BL/6) and G-H (CCL3^{-/-}) show samples of treated mice after 28 weeks with 4NQO.

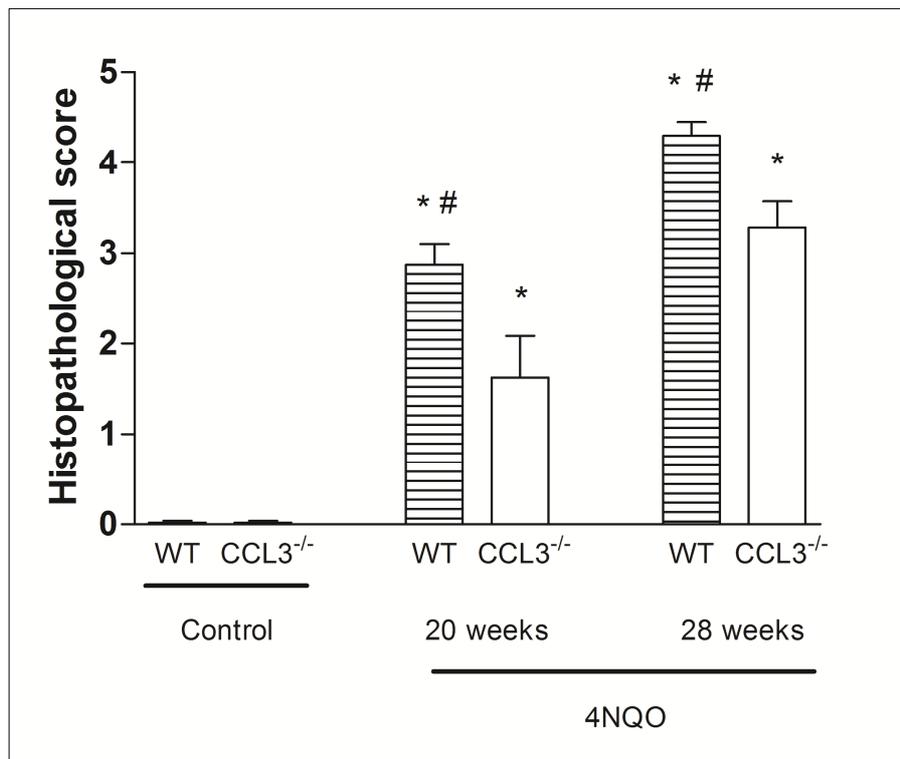


FIGURE 4 – Histopathological scores obtained for controls and experimental groups treated for 20 or 28 weeks with 4NQO. * $p < 0.05$ when compared to respective controls. # $p < 0.05$ comparing treated WT and CCL3^{-/-} mice.

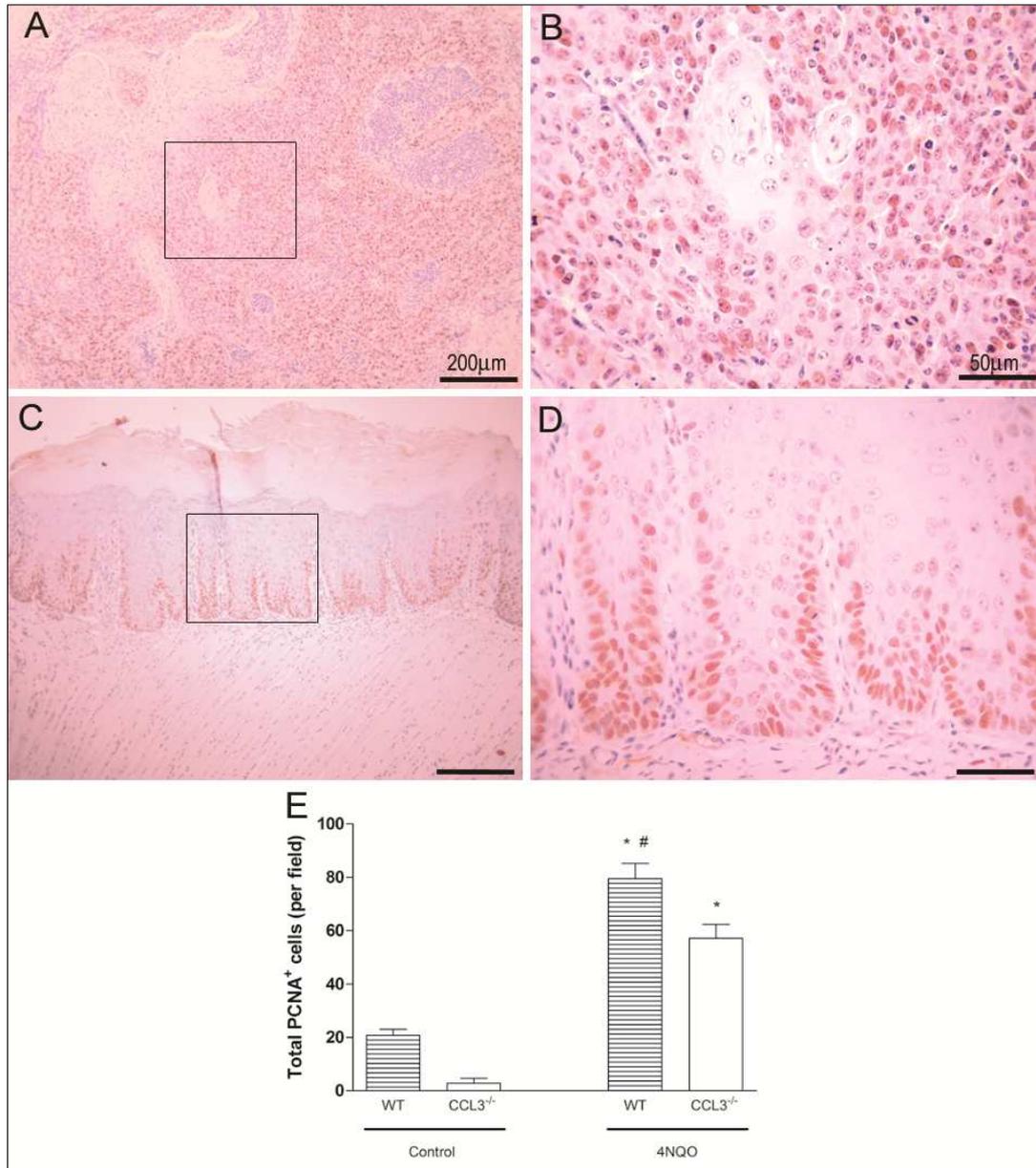


FIGURE 5 – Immunohistochemical expression of PCNA in tongue of C57BL/6 (A, B) and CCL3^{-/-} (C,D) -treated mice for 28 weeks with 4NQO. (E) Quantification of total PCNA positive cells in control and groups treated for 28 weeks with 4NQO. * $p < 0.05$ when compared to respective controls. # $p < 0.05$ comparing treated WT and CCL3^{-/-} mice.

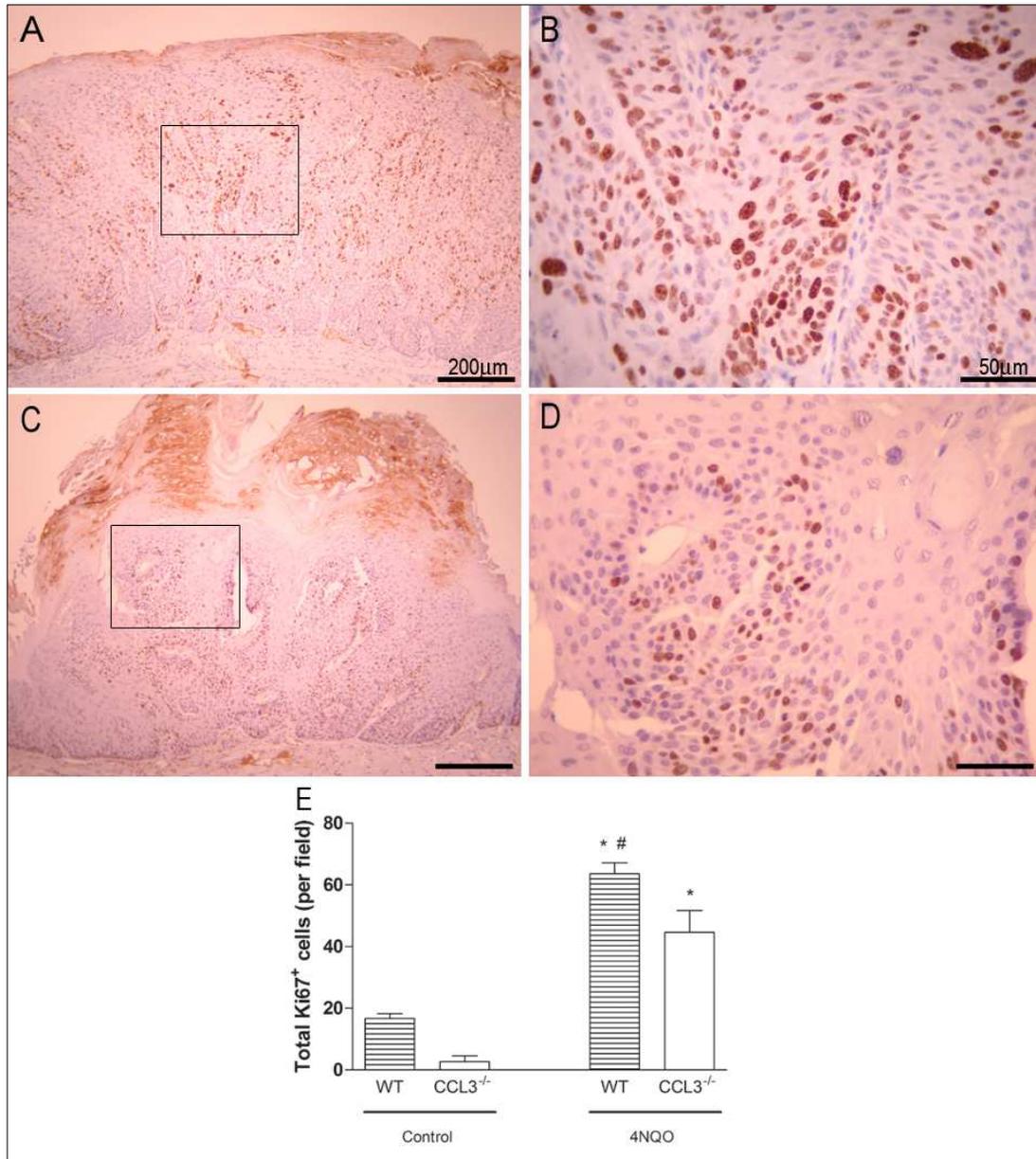


FIGURE 6 - Immunohistochemical expression of Ki67 in tongue of C57BL/6 (A, B) and CCL3^{-/-} (C, D) -treated mice for 28 weeks with 4NQO. (E) Quantification of total Ki67 positive cells in control and groups treated for 28 weeks with 4NQO. * $p < 0.05$ when compared to respective controls. # $p < 0.05$ comparing treated WT and CCL3^{-/-}

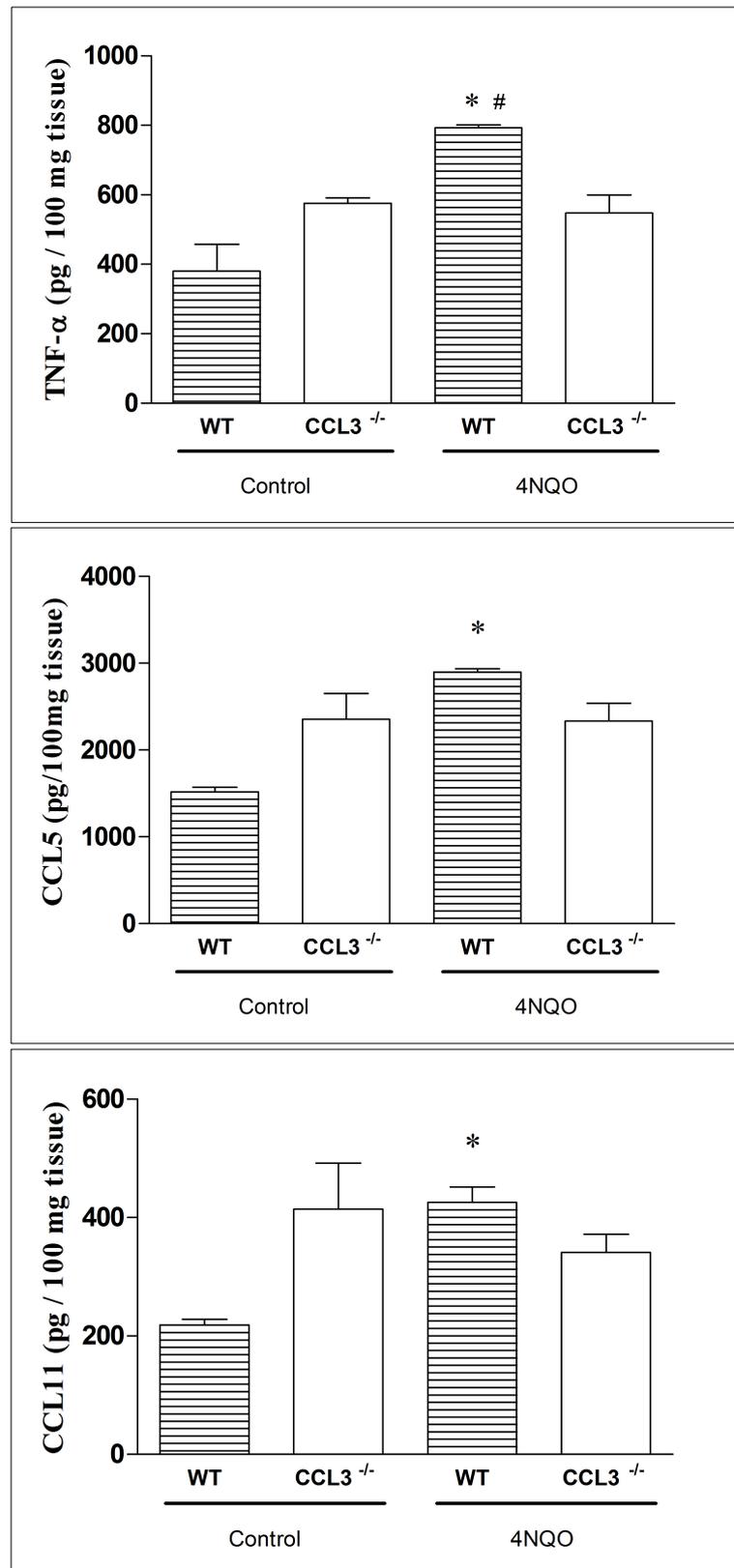


FIGURE 7 – Concentration of TNF- α , CCL5 and CCL11 in control and experimental groups treated for 28 weeks with 4NQO. * $p < 0.05$ when compared to respective control; # $p < 0.05$ when comparing treated WT and CCL3^{-/-} mice.

REFERENCES

1. Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RCG, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:74-79.
2. Shang ZJ, Liu K, Shao Z. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:480-485.
3. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:67-76.
4. Lu SL, Herrington H, Wang XJ. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006;28:945-954.
5. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen treated mice. *Clin Canc Res* 2004;10:301-313.
6. Schoop RAL, Noteborn MHM, Jong RJB. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Hist* 2009;40:177-181.
7. Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 2006;42:655-667.

8. Gasparoto TH, Malaspina TSS, Benevides L, Melo Jr. EJJ, Costa MRSN, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:819–828.
9. Zancopé E, Costa NL, Kipnis APJ, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, et al. Cytotoxic lymphocytes are associated with better prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2010; 39:162–167.
10. Ferreira FO, Ribeiro FLL, Batista AC, Leles CR, Alencar RCG, Silva TA. Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2008;29:114–121.
11. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol* 2012;226(2):148-157.
12. Silva TA, Ribeiro FLL, Oliveira-Neto HH, Watanabe S, Alencar RCG, Fukada SY, et al. Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. *Oncol Rep* 2007;18:1107-1113.
13. Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2010;21:27-39.

14. Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, Mendonça EF, Alencar RC, Silva TA, et al. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol* 2008;29(4):262-271.
15. Lu P, Nakamoto Y, Nemoto-Sasaki Y, Fujii C, Wang H, Hashii M, et al. Potential Interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *American J Pathol* 2003;162(4):1249-1258.
16. Terpos E, Tasidou A, Papaiakovou EE, Christoulas D, Gavriatopoulou M, Gkatzamanidou M, et al. Expression of CCL3 by neoplastic cells in patients with Waldenström's Macroglobulinemia: an immunohistochemical study in bone marrow biopsies of 67 patients. *Clin Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2011;11(1):115-117.
17. Yang X, Lu P, Fujii C, Nakamoto Y, Gao JL, Kaneko S, et al. Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. *Int J Canc* 2006;118:1869–1876.
18. Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J Immunol* 2008;181:6384-6393.
19. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, , Sidransky D. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours.* World Health Organization; 2005.

20. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Fonseca AH, Klein A, Caliari MV, Francischi JN. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. *Mediators of Inflammation* 2009;1-7.
21. Xia J, Wang J, Chen N, Dai Y, Hong W, Chen X, et al. Expressions of CXCR7/ligands may be involved in oral carcinogenesis. *J Mol Hist* 2011;42:175–180.
22. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncol* 2004;40:287-297.
23. Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1{alpha} induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164;3392-3401.
24. Hamed H, Zaki S. Role of CCL3 protein (monocyte inflammatory protein-1 alpha) in lymphoid malignancy. *Egypt J Immunol.* 2007;14(1):63-72.
25. Nath A, Chattopadhyaya S, Chattopadhyay U, Sharma NK. Macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α and MIP1 β differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:1534-1541.

26. Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, et al. Involvement of macrophage inflammatory protein 1 α (MIP1 α) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis* 2010;31(5):927–935.
27. Lentzsch S, Gries M, Janz M, Bargou R, Dörken B, Mapara MY. Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1a) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 2003;101:3568-3573.
28. Nakashima E, Oya A, Kubota Y, Kanada N, Matsushita R, Takeda K, et al. A candidate for cancer gene therapy: MIP-1 alpha gene transfer to an adenocarcinoma cell line reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice. *Pharm Res* 1996;13(12):1896-901.
29. Nolen BM, Lokshin AE. Targeting CCL11 in the treatment of ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(2):157-167.
30. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A et al. Expression of CCR5 receptors on Reed–Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: Involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int. J. Cancer* 2008;122:769–776.
31. Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *Prostate* 2006;66:124-134.

32. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters* 2008;267:271-285.
33. Weng CJ, Chien MH, Lin CW, Chung TT, Zavras AI, Tsai CM, et al. Effect of CC chemokine ligand 5 and CC chemokine receptor 5 genes polymorphisms on the risk and clinicopathological development of oral cancer. *Oral Oncol* 2010;46:767-772.
34. Balkwill FR. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:409-416.
35. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Medicine* 1999;5(7):828-831.
36. Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res* 1999;59:4516-4518.
37. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR. Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 2004;23:1902-1910.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunidade científica é unânime ao considerar que é muito importante aprofundar conhecimentos em relação aos eventos moleculares, genéticos e bioquímicos que ocorrem no processo de carcinogênese bucal. Entretanto, pesquisas que utilizam biópsias de tumores de boca humanos possuem algumas limitações, principalmente pela grande variabilidade de amostras, com estágios clínicos e características genotípicas diferentes, e pelo uso de diferentes parâmetros de avaliação. Tal dificuldade motivou a realização deste trabalho.

O estudo em animais pode ser uma alternativa, visto que os tumores induzidos possuem características clínicas e histológicas similares dentro de um mesmo grupo. Além disso, o estágio das lesões segue um padrão temporal semelhante para os animais. Desta forma, estes estudos permitem controlar a maioria dos vieses, e garantem boa confiabilidade nos resultados.

O modelo utilizado neste estudo possui muitas vantagens, como já foi descrito previamente (KANOJIA; VAIDYA, 2006; LU *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2004). Contudo, possui também algumas limitações como o longo tempo necessário para a indução dos tumores (28 semanas). Tal limitação traz outra dificuldade: a de realizar experimentos visando estratégias terapêuticas. Além disso, as características do infiltrado das lesões induzidas desencorajam tentativas futuras de caracterização da população celular inflamatória. Sabe-se que células inflamatórias em íntima associação com o estroma tumoral podem influenciar o prognóstico do CCEB. Nosso estudo revelou a presença de uma pequena ou quase ausente população de células inflamatórias dentro dos tumores, o que pode ser confirmado pelos dados morfológicos e de produção de MPO. Além disso, o tratamento com o 4NQO não foi capaz de induzir metástases em

órgãos distantes. Isto limita a busca pelo entendimento de como acontece a cinética de migração das células neoplásicas neste modelo. Portanto, caracterizar o infiltrado inflamatório neste modelo pode ser um entrave na evolução dos trabalhos. Neste sentido, o emprego de um modelo utilizando o DMBA pode ser uma perspectiva, visto que as lesões provocadas durante o tratamento possuem uma resposta inflamatória mais expressiva (FRENKEL *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2002).

A utilização de imuno-histoquímica para tentar quantificar marcadores específicos nestas lesões torna-se um desafio devido às limitações da técnica e do observador, apesar do baixo custo e facilidade. Contudo, o emprego de técnicas de quantificação por *real time PCR* (reação em cadeia da polimerase) se apresentam como uma ferramenta importante.

O papel de CCL3 necessita ser melhor esclarecido. Sua participação na tumorigênese parece ser importante para o recrutamento de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios que podem favorecer a degradação da matriz extracelular, e consequentemente a migração de células tumorais para sítios distantes. Entretanto, sabe-se que o processo de carcinogênese é muito complexo, no qual ocorre interação de outras moléculas, bem como de diferentes populações celulares que podem favorecer ou antagonizar a resposta do hospedeiro contra o tumor.

6 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1. O modelo com o 4NQO mostrou-se eficaz para indução de tumores na língua dos camundongos.
2. Nossos dados sugerem a participação da quimiocina CCL3 na carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO, a qual pode estar relacionada a modificações locais nos níveis de TNF- α .

7 PERSPECTIVAS

Com base nos achados deste estudo, algumas perguntas motivam a continuidade deste trabalho:

1 – A(s) ação(ões) de CCL3 neste modelo de carcinogênese ocorre(m) predominantemente via ligação a CCR1, CCR5 ou ambos?

Dados da literatura e também do nosso grupo demonstraram que a ligação de CCL3 nestes receptores pode resultar em ações sinérgicas ou antagônicas dependendo do modelo de estudo (ANDRADE JR *et al.* 2009; FERREIRA JR *et al.*, 2011; ROFFÊ *et al.*, 2010). Para responder a esta questão, pretende-se realizar experimentos empregando-se animais geneticamente deficientes dos receptores CCR1 e CCR5.

2 – Qual o mecanismo pelo qual CCL3 influencia a progressão tumoral?

Com base na literatura, duas hipóteses podem ser estabelecidas: **a primeira** é de que a quimiocina provoca o recrutamento de leucócitos, principalmente macrófagos, para o sítio tumoral, resultando na liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios e angiogênicos, o que favoreceria a migração celular e o surgimento de metástases. Para tentar responder a tal questionamento pretende-se verificar a expressão de um marcador vascular (Fator Von Willebrand, também conhecido como Fator VIII) por técnica imuno-histoquímica. Analisaremos então, a existência ou não de diferença entre os grupos CCL3(KO) e C57(WT). De acordo com nossos achados até o presente momento, espera-se que o grupo dos WT tratados com 4NQO possua maior expressão deste marcador. Caso sejam observadas diferenças significativas, outros marcadores envolvidos na angiogênese (como VEGF) serão analisados por qPCR.

Em um recente experimento realizado em nosso laboratório, verificamos uma redução da expressão do marcador F4/80 (expresso por macrófagos teciduais maduros) nos animais CCL3^{-/-} em comparação aos C57(WT). A partir destes dados formulou-se também a **segunda** hipótese, na qual a quimiocina CCL3 poderia estar envolvida na polarização macrofágica e desta forma influenciar a resposta do hospedeiro ao tumor. Os macrófagos podem assumir um fenótipo M1 (classicamente ativado) ou M2 (alternativamente ativado), baseado no perfil das respostas Th1/Th2, respectivamente. Sabe-se que macrófagos associados a tumores (TAM's) estão associados com proliferação e sobrevivência de células malignas, angiogênese, remodelamento do estroma e formação de metástases (MANTOVANI *et al.*, 2008; RUFFEL *et al.*, 2012; SOLINAS *et al.*, 2010). Tal polarização é estimulada em resposta às citocinas e mediadores expressos, em diferentes tumores. Em geral, macrófagos M1 são induzidos por IFN- γ , ou em conjunto com outras citocinas como o TNF- α e GM-CSF, ou LPS. Os macrófagos M2 podem ser induzidos pela liberação de IL-4 e IL-13, por exemplo (ALLAVENA *et al.*, 2008; RUFFELL *et al.*, 2012).

Para responder a este questionamento, pretende-se verificar a expressão de alguns potenciais marcadores desta polarização fenotípica, como por exemplo: M1 (IFN- γ , iNOS, COX-2) e M2 (Manose, Arginase e IL-4) empregando-se qPCR.

Caso seja confirmado o papel da polarização macrofágica, pretende-se também avaliar o papel de CCL2 neste modelo, uma vez que a quimiocina CCL2 é provavelmente a quimiocina mais comumente encontrada em alguns tipos de tumores (sarcomas, tumores de pulmão, tumores ovarianos e de mama) e que a mesma possui um papel fundamental no recrutamento e infiltração e polarização macrofágica (MANTOVANI *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2011). Além disto, dados do nosso grupo demonstraram a expressão desta molécula no CCEB e sua relação com o pior prognóstico (FERREIRA

et al., 2008). A investigação do papel de CCL2 será realizada empregando-se animais deficientes de CCR2, um dos principais receptores de CCL2.

Outra perspectiva que motiva a continuação deste trabalho é a de realizar experimentos visando estratégias terapêuticas, que podem ser executados bloqueando-se a quimiocina CCL3. Existem interessantes trabalhos na literatura que mostram o efeito da administração de Evasina-1, um ligante com alta afinidade por CCL3, capaz de modular negativamente sua função (RUSSO *et al.*, 2011; CASTOR *et al.*, 2010). Sendo assim, pretende-se realizar um experimento no qual os animais seriam tratados com o 4NQO por um período menor, mas suficiente para induzir as alterações (16 semanas), e, em seguida administrar a Evasina-1 pelo restante do período experimental e avaliar o efeito terapêutico produzido. A avaliação será conduzida sob os mesmos parâmetros já realizados até este ponto da pesquisa. Nossa teoria é que possivelmente o tratamento com Evasina-1 seja capaz de reduzir a incidência de tumores, bem como dos mediadores inflamatórios envolvidos.

REFERÊNCIAS

ALDINUCCI, D.; LORENZON, D.; CATTARUZZA, L.; *et al.* Expression of CCR5 receptors on Reed–Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: Involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int. J. Cancer*, Aviano v. 122, p.769–776, Feb. 2008.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; *et al.* The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical Rev in Oncology/Hematology*, Milan v. 66, p. 1-9, Jul. 2008.

ANDRADE, JR. I.; TADDEI, S. R. A.; GARLET, G. P.; *et al.* CCR5 Down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, Belo Horizonte v. 88, n. 11, p. 1037-1041, Jun. 2009.

ARNOTT, C. H.; SCOTT, K. A.; MOORE, R. J.; *et al.* Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene*, v. 23, p. 1902-1910, Mar. 2004.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENES, Y. *et al.* Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology*, Valencia, v. 46, p. 414–417, Apr. 2010.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leucocyte traffic. *Nature*, Bern, v. 392, n. 9, p. 565-568, Apr. 1998.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews*, London, v.4, p. 540-549, Jul. 2004.

BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, London, v.25, p. 409-416, Sep. 2006.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, v. 357, p. 539-545, Feb. 2001.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P. A.; *et al.* *World Health Organization classification of tumours*. Pathology and genetics. Head and neck tumours. World Health Organization; 2005.

BOYD, N. M.; READE, P. C. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *Oral Pathol*, Melbourne v. 17, p. 193-201, Apr. 1988.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.

CASTOR, M. G. M.; RESENDE, B.; RESENDE, C. B.; *et al.* The CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1 α -binding protein Evasin-1 protects from Graft-versus-Host Disease but does not modify Graft-versus-Leukemia in mice. *J Immunol*, Belo Horizonte, v. 184, p. 2646-2654, Jan. 2010.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, San Francisco, v. 420, p. 19-26, Dec. 2002.

DERKA, S.; VAIRAKTARIS, E.; PAPAKOSTA, V.; *et al.* Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncology*, Athens, v. 42, n. 5, p. 540-550, May 2006.

FARIA, P. R. *Carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO em língua de camundongos knockout para o gene da galectina-3*. 2006. 119f. Tese (Doutorado em Patologia Geral). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.

FERREIRA, F. O.; RIBEIRO, F. L. L.; BATISTA, A. C.; *et al.* Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*, Belo Horizonte, v. 29, p.114–121, Jun. 2008.

FERREIRA, JR. S. B.; REPEKE, C. E.; RAIMUNDO, F. M.; *et al.* CCR5 Mediates pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. *J Dent Res*, São Paulo v. 90, n. 5, p. 632-637, Oct. 2011.

FONSECA, L. M. S. *Alterações da mucosa bucal de camundongos BALB/C induzidas pelo carcinógeno 4-NQO: efeito da vitamina E*. 2003. 145f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FRENKEL, K.; WEI, L.; WEI, H. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induces oxidative DNA modification in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, New York v.19, n.3, p.373-380, Mar. 1995.

GASPAROTO, T. H.; TATIANA SALLES DE SOUZA MALASPINA, T. S. S.; BENEVIDES, L.; *et al.* Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, São Paulo, v. 59, p. 819–828, Dec. 2009.

GRIMMINGER, C. M.; DANEMBERG, P. V. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Los Angeles, v. 268, p. 5–16, Sep. 2011.

HANAHAN, D.; LANZAVECCHIA, A.; MIHICH, E. Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors. *Cancer Res*, San Francisco, v.63, p. 3005-3008, Jun. 2003.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*, Mumbai, v.42, p. 655-667, Oct. 2006.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Disease*, Cambridge, v. 26, p. 75-85, 2006-2007.

LEE, J. J.; HONG, W. K.; HITTELMAN, W. N.; *et al.* Predicting Cancer Development in Oral Leukoplakia: Ten Years of Translational Research. *Clin Cancer Res*, Houston, v. 6, p. 1702-1710, May 2000.

LI, X.; ECKARD, J.; SHAH, R.; *et al.* Interleukin-1alpha up-regulation in vivo by a potent carcinogen 7,12 dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) and control of DMBA induced inflammatory responses. *Cancer Res*, New York, v.62, n.2, p.417-423, Jan. 2002.

LORENA, S. C. M.; OLIVEIRA, D. T.; DORTA, R. G.; *et al.* Eotaxin expression in oral squamous cell carcinomas with and without tumour associated tissue eosinophilia. *Oral Diseases*, São Paulo v. 9, p. 279-283, Jun. 2003.

LU, P.; NAKAMOTO, Y.; NEMOTO-SASAKI, Y.; *et al.* Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *American J Pathol*, Kanazawa, v. 162, n. 4, p. 1249-1258, Apr. 2003.

LU, S. L.; HERRINGTON, H.; WANG, X. J. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, Oregon, v. 28, p. 945-954, Oct. 2006.

MANTOVANI, A.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; *et al.* Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *European Journal of Immunology*, Milan, v. 41, p. 2470-2525, Jul. 2011.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI M.; *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, Milan, v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov. 2002.

MOORE, R. J.; OWENS, D. M.; STAMP, G; *et al.* Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Medicine*, v. 5, n.7, p. 828-831, Jul. 1999.

NAKASHIMA, E.; OYA, A.; KUBOTA, Y.; *et al.* A candidate for cancer gene therapy: MIP-1 alpha gene transfer to an adenocarcinoma cell line reduced tumorigenicity and induced protective immunity in immunocompetent mice. *Pharm Res*, v.13, n. 12, p. 1896-901, Dec. 1996.

NATH, A.; CHATTOPADHYA, S.; CHATTOPADHYAY, U.; *et al.* Macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α and MIP1 β differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunol Immunother*, Pittsburgh, v. 55, p. 1534-1541, Mar. 2006.

NAUTA, J. M.; ROODENBURG, J. L.; NIKKELS, P. G. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck*, Groningen, v. 18, n. 5, p. 441-449, Sep-Oct 1996.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin*, Atlanta, v. 52, p.195-215, Jul-Aug. 2002.

NOLEN, B. M.; LOKSHIN, A. E. Targeting CCL11 in the treatment of ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets*, Pittsburgh v.14, n.2, p.157-167, Feb. 2010.

NUNOSHIBA, T.; DEMPLE, B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res*, Boston, v. 53, n. 14, p.3250-2, Jul. 1993.

RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F.; SILVA, R. N.; *et al.* Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncology*, Botucatu, v. 40, p. 910-915, Apr. 2004.

ROFFÊ, E.; OLIVEIRA, F.; SOUZA, A. L. S.; *et al.* Role of CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes and Infection*, Belo Horizonte, v. 12, p. 669-676, May 2010.

RUFFELL, B.; AFFARA, N. I.; COUSSENS, L. M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in immunology*, San Francisco, v. 33, n. 3, p. 119-126, Mar. 2012.

RUSSO, R. C.; ALESSANDRI, A. L.; GARCIA, C. C. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, Belo Horizonte, v. 45, p. 72-80, Sep. 2011.

SALCEDO, R.; YOUNG, H. A.; PONCE, M. L.; *et al.* Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3⁺ endothelial cells. *Journal of Immunol*, Bethesda v. 166, p. 7571-7578, Apr. 2001.

SCHOOP, R. A. L.; NOTEBORN, M. H. M.; JONG, R. J. B. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Hist*, Leiden, v.40, p. 177-181, Aug. 2009.

SCULLY, C; BAGAN, J. V. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases*, Valencia, v. 15, p. 388-399, Mar. 2009.

SHANG, Z. J.; LIU, K.; SHAO, Z. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, Wuhan v.45, p.480-485, Aug. 2009.

SILVA, T. A.; RIBEIRO, F. L. L.; OLIVEIRA-NETO, H. H.; *et al.* Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. *Oncol Rep*, Belo Horizonte, v. 18, p. 1107-1113, Jul. 2007.

SILVERMAN, S. JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: the outcomes, the trends, the challenge. *Journal of American Dental Association*, San Francisco, v. 132, p. 75-115, Nov. 2001.

SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*, Tel Aviv v. 267, p. 271-285, Aug. 2008.

SUGANUMA, M.; OKABE, S.; MARINO, M. W.; *et al.* Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res*, v. 59, p.4516-4518, Sep. 1999.

TANG, X. H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TICKOO, S.; *et al.* Oral Cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen treated mice. *Clin Canc Res*, New York, v. 10, p. 301-313, Oct. 2004.

TERPOS, E.; TASIDOU, A.; PAPAIAKOVOU, E. E.; *et al.* Expression of CCL3 by neoplastic cells in patients with Waldenström's Macroglobulinemia: an immunohistochemical study in bone marrow biopsies of 67 patients. *Clin Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, Athens, v. 11, n. 1, p.115-117, Feb. 2011.

VADAY, G. G.; PEEHL, D. M.; KADAM PA; *et al.* Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *Prostate*, New York v. 66, p. 124-134, Feb. 2006.

VERED, M.; ALLON, I.; BUCHNER, A.; *et al.* Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncology*, Tel Aviv, v. 43, p. 999-1006, Jan. 2007.

WENG, C. J.; CHIEN, M. H.; LIN, C. W.; *et al.* Effect of CC chemokine ligand 5 and CC chemokine receptor 5 genes polymorphisms on the risk and clinicopathological development of oral cancer. *Oral Oncol*, Tainan v. 46, p. 767-772, Aug. 2010.

WILLIAMS, H. Q. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol Mol Pathol*, Birmingham v. 53, p. 165-172, May 2000.

WU, Y.; LI, Y. Y.; MATSUSHIMA, K.; *et al.* CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. *J Immunol*, Kanazawa, v. 181, p. 6384-6393, Aug. 2008.

YANG, X.; LU, P.; FUJII, C.; *et al.* Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. *Int J Canc*, Kanazawa, v. 118, p. 1869-1876, Nov. 2006.

ZANCOPE, E.; COSTA, N. L.; KIPNIS, A. P. J.; *et al.* Cytotoxic lymphocytes are associated with better prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, Goiânia, v. 39, p. 162–167, Apr. 2010.

ANEXOS

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG).



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

CERTIFICADO

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

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

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 4 de Abril de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

Anexo II - Percentuais dos escores histopatológicos obtidos para os grupos controle e tratados com 4NQO por 20 e 28 semanas.

Escore	Controles		4NQO			
	WT	CCL3 ^{-/-}	20 semanas		28 semanas	
			WT	CCL3 ^{-/-}	WT	CCL3 ^{-/-}
0	<i>n=5</i> (100%)	<i>n=5</i> (100%)	-	<i>n=2</i> (25%)	-	-
1	-	-	-	<i>n=2</i> (25%)	-	-
2	-	-	<i>n=2</i> (25%)	<i>n=1</i> (12,5%)	-	<i>n=1</i> (14,4%)
3	-	-	<i>n=5</i> (62,5%)	<i>n=3</i> (37,5%)	-	<i>n=3</i> (42,8%)
4	-	-	<i>n=1</i> (12,5%)	-	<i>n=7</i> (70%)	<i>n=3</i> (42,8%)
5	-	-	-	-	<i>n=3</i> (30%)	-