

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA CARCINOGENESE ORAL:
ESTUDO EXPERIMENTAL**

Aracaju

Agosto/2015

DANIELLE PRADO LEITE

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA CARCINOGENESE ORAL:
ESTUDO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Rabello Piva

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora dos Santos Tavares

Aracaju

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

L533 Leite, Danielle Prado

Influência da inflamação na carcinogênese oral: estudo experimental / Danielle Prado Leite ; orientadora Marta Rabello Piva, Co-orientadora Débora dos Santos Tavares. – Aracaju, 2015.

40 f., il.

Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Odontologia. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Inflamação. 4. Corticosteroide. 5. Citocinas. I. Piva, Marta Rabello, orient. II. Tavares, Débora dos Santos, co-orient. III. Título.

CDU 616.314

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é o tumor maligno mais comum da cavidade oral e pode se manifestar como uma úlcera, uma lesão exofítica ou um nódulo de consistência variável em qualquer parte da boca, sendo a língua o sítio mais acometido. Existem evidências de que a inflamação, provocada pelo processo de reparo decorrente de uma biópsia incisional ou de traumas semelhantes, pode estimular a transformação e/ou progressão das células tumorais, e que é real a possibilidade de promoção do crescimento tumoral acarretado pela resposta inflamatória e pelo processo de reparo.

Objetivo: Avaliar a influência da inflamação no processo de carcinogênese oral através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática. **Material e Método:** Foi realizado um estudo experimental em ratas Wistar subdivididas em grupos controle negativo (grupo 0), controles positivos (1A e 1B), grupos submetidos a estímulo inflamatório (2A e 2B) e grupos submetidos à administração de corticosteroide (3A e 3B), em que os grupos 1A, 2A e 3A foram induzidos por 15 semanas e os grupos 1B, 2B e 3B por 33 semanas, através do pincelamento de 4NQO a 0,7% diluído em propilenoglicol na língua dos animais. Estudo macroscópico e análise histológica foram realizados para caracterização das lesões desenvolvidas, além de ensaio imunoenzimático para avaliação das interleucinas 2 e 10 no desenvolvimento e progressão da carcinogênese oral. **Resultado:** A análise macroscópica revelou que mucosa de aspecto esbranquiçado foi observada em todos os animais submetidos à aplicação de 4NQO. Lesões brancas e/ou placas eritematosas foram encontradas em todos os grupos, com predomínio entre os animais induzidos por mais semanas. Lesões exofíticas foram observadas somente em um animal do grupo 1A, um animal do grupo 1B e dois animais do grupo 2B. O escore médio de displasia epitelial foi de 30,3 (1A), 51,0 (1B), 29,8 (2A), 41,8 (2B), 30,8 (3A) e 34,0 (3B), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos 1A x 1B, 1B x 2B e 1B x 3B. Com relação às concentrações de IL-2 e IL-10, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém houve um aumento visível da IL-10 no grupo 1A, estágio inicial de transformação tumoral, sugerindo que o aumento de IL-10 possa interferir nessa transformação. Avaliando a IL-2 entre os grupos A e B (15 e 33 semanas de indução, respectivamente), notou-se uma diferença mais acentuada entre os grupos 2A e 2B (estímulo inflamatório), enquanto que, entre os grupos 3A e 3B (corticosteroide), a concentração permaneceu praticamente inalterada. **Conclusão:** O estímulo inflamatório não foi suficiente para causar alteração histológica, mas o uso do corticosteroide interferiu na progressão tumoral; é necessária a realização de novos

estudos que avaliem as concentrações de IL-2 e IL-10 em uma amostra maior e/ou dentro das lesões, relacionando-os com as concentrações no sangue periférico, para confirmação dos achados.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Inflamação; Corticosteroide; Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity and can manifest itself as an ulcer, one exophytic lesion or a nodule of varying consistency anywhere in the mouth, being tongue the most committed place. There is evidence that inflammation caused by the repair process due to an incisional biopsy or similar trauma, can stimulate the transformation and/or progression of tumor cells, and that is real the possibility of promoting tumor growth called out by the inflammatory response and the repair process. **Objective:** Evaluate the influence of inflammation in the process of oral carcinogenesis through macroscopical and histological analysis and enzyme immunoassay. **Material and Method:** An experimental study was conducted in Wistar rats subdivided into negative control group (group 0), positive control groups (1A and 1B), groups submitted to inflammatory stimulus (2A and 2B) and groups subject to the administration of corticosteroids (3A and 3B), in which groups 1A, 2A and 3A were induced for 15 weeks and the groups 1B, 2B and 3B for 33 weeks, by brushing the 4NQO diluted in 0.7% propylene glycol on the tongue of the animals. Macroscopic and histological studies were performed to characterize the lesions, besides enzyme immunoassay to evaluate interleukins 2 and 10 in the development and progression of oral carcinogenesis. **Results:** Macroscopic analysis revealed that whitish mucosa was observed in all animals submitted to the application of 4NQO. White and/or erythematous plates were found in all groups, with high prevalence between animals induced for more weeks. Lesions in later stages were found only in one animal in 1A group, one animal in 1B group and two animals in 2B group. The mean score of epithelial dysplasia was 30.3 (1A), 51.0 (1B), 29.8 (2A), 41.8 (2B), 30.8 (3A) and 34.0 (3B), with difference statistically significant ($p < 0.05$) between 1A x 1B, 1B x 2B and 1B x 3B. Concerning to IL-2 and IL-10 concentrations, there was no difference statistically significant between groups ($p > 0.05$), but there was a visible increase in IL-10 levels in 1A group, early stage of tumor transformation, suggesting that IL-10 increase can interfere in this transformation. Evaluating IL-2 between A and B groups (15 and 33 weeks of indução, respectively), it was noticed a more marked difference between the groups 2A and 2B (inflammatory stimulus), while between groups 3A and 3B (corticosteroids), the concentration remained virtually unchanged. **Conclusion:** It is suggested that the inflammatory stimulus is not sufficient to cause any histological alteration, but the use of corticosteroids appears to interfere with tumor progression; it is necessary to carry out new studies to evaluate the IL -2 and IL-10

concentrations in a larger sample and/or within the lesions, relating them to the concentrations in the peripheral blood.

Key words: Carcinoma, squamous cells; Inflammation; Corticosteroids; Cytokines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 HIPÓTESES	3
2 OBJETIVOS	4
3 METODOLOGIA.....	5
4 RESULTADOS	10
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
6 COMUNICADO DE IMPRENSA	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO A.....	30
ANEXO B.....	31
ANEXO C.....	34

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é o tumor maligno mais comum da cavidade oral e pode se manifestar como uma úlcera, uma lesão exofítica ou um nódulo de consistência variável em qualquer parte da boca, sendo a língua o sítio intraoral mais comum, responsável por cerca de 40% dos casos^{1,2}. A incidência do CCEO é em torno de 8,2/100.000 casos/ano entre os homens e 2,8/100.000 casos/ano entre as mulheres e normalmente se manifesta entre as 5^a, 6^a e 7^a décadas de vida, embora o número de pacientes acometidos com menos de 45 anos esteja aumentando. No Brasil, foram previstos 576 mil novos casos da doença para o ano de 2014, apresentando um aumento de 10% com relação ao levantamento realizado no período anterior³.

Por cerca de dois milênios, uma relação causal entre inflamação e câncer foi suspeita. Galen foi o primeiro a observar essa relação e, mais tarde, no século XIX, Rudolf Virchow demonstrou a presença de leucócitos em tecidos malignos e afirmou que os tumores surgem a partir de regiões de inflamação crônica⁴.

Células inflamatórias estão presentes em todos os tumores. O papel das citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias têm sido associadas com a inflamação crônica. Sabe-se há algum tempo que doenças inflamatórias crônicas aumentam o risco de desenvolvimento do câncer em alguns órgãos, como por exemplo: trato gastrointestinal, próstata, tireoide, pâncreas, bexiga, pleura e outros⁵.

As citocinas são um importante grupo de proteínas que regulam e medeiam a inflamação e a angiogênese. O crescimento do tumor, invasão e metástase são facilitados quando há uma desregulação na sua produção. As citocinas incluem interleucinas, fatores de necrose tumoral e certos fatores de crescimento. Uma série de estudos de associação genética recentemente investigou a correlação entre polimorfismos de DNA em genes funcionais de citocinas e carcinomas de cabeça e pescoço⁶.

Além disso, apesar do grande número de estudos envolvendo a participação das interleucinas na progressão tumoral, o papel de algumas delas ainda não está verdadeiramente claro. A interleucina-2 (IL-2) é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T, induzindo ciclo celular para células T não-ativadas e expansão clonal de células T ativadas. É um agente proliferativo antígeno inespecífico. Ativa ainda células B, necessitando para tal de fatores adicionais, como

IL-4. Estimula a proliferação e ativação de células CD8+, tendo assim atividade antitumoral⁷. A imunoterapia do câncer com IL - 2 tem demonstrado controle da doença em longo prazo em carcinoma de células renais metastático e melanoma maligno⁸.

A interleucina-10 (IL-10), primeiro reconhecida pela sua capacidade para inibir a ativação de células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina multifuncional com diversos efeitos sobre a maioria dos tipos de células hematopoiéticas. A principal função de rotina de IL-10 parece ser para limitar e, finalmente, terminar respostas inflamatórias. Além destas atividades, a IL-10 regula o crescimento e / ou diferenciação de células B, células NK, células T auxiliares e citotóxicas, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos, e células endoteliais⁹.

A deficiência de IL-10 em ratos sugere que essa citocina atua como um imunorregulador essencial no trato intestinal e mutações em IL-10 estão também associadas à susceptibilidade aumentadas a infecção por HIV-1 e artrite reumatóide. Pacientes com AIDS e linfoma de Burkitt secretam grandes quantidades de IL-10. A síntese é inibida por IL-4 e pela própria IL-10. Extensas pesquisas têm indicado que polimorfismos funcionais que afetam a expressão do gene de IL-4, -6, -8, -10, assim como TNF- α estão fortemente associados com risco aumentado para câncer oral⁶.

IL-10 é uma citocina imunomoduladora que é frequentemente sobre-regulada em vários tipos de câncer. O papel biológico da IL-10 no câncer é bastante complexo. No entanto, sua presença em metástases avançadas e a correlação positiva entre níveis séricos de IL-10 e os níveis de progressão da doença indica um papel crítico de IL-10 no microambiente tumoral¹⁰.

Com relação ao diagnóstico do câncer oral, a análise histopatológica realizada após o procedimento de biópsia incisiva atua como uma importante ferramenta, podendo indicar o grau de diferenciação e o tipo celular envolvido, servindo de parâmetro para a escolha do melhor tratamento. Existem evidências de que a inflamação, provocada pelo processo de reparo decorrente de uma biópsia incisiva ou de traumas semelhantes, pode estimular a transformação e/ou progressão das células tumorais, e que é real a possibilidade de promoção do crescimento tumoral acarretado pela resposta inflamatória e pelo processo de reparo^{11,12}. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da inflamação no processo de carcinogênese oral através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática.

2 HIPÓTESES

- A inflamação gerada através do procedimento de biópsia é capaz de levar à progressão de lesões orais malignas/potencialmente malignas;
- Os corticosteroides podem reduzir a progressão tumoral na carcinogênese oral.

2 OBJETIVOS

- *Geral*

Avaliar a influência da inflamação no processo de carcinogênese oral através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática.

- *Específicos*

- Analisar macro e microscopicamente as lesões geradas na língua de ratas Wistar após indução por 4NQO;
- Avaliar o infiltrado inflamatório nas línguas submetidas à indução por 4NQO;
- Avaliar a expressão da IL-2 e IL-10 no sangue periférico de ratas por meio de ensaio imunoenzimático;
- Comparar a expressão da IL-2 e IL-10 entre o sangue periférico de ratas submetidas a estímulo inflamatório e ratas não submetidas ao estímulo inflamatório após indução por 4NQO;
- Comparar a expressão da IL-2 e IL-10 entre o sangue periférico de ratas submetidas à administração de corticosteroide e ratas não submetidas à administração de corticosteroide após indução por 4NQO;

3 METODOLOGIA

3.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

O estudo teve início após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Sergipe, sob protocolo de número 33/2013 (Anexo A).

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental, controlado e randomizado, para avaliação da influência da inflamação no processo de carcinogênese induzida por 4NQO em ratas Wistar, através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática.

3.3 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 33 ratas Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Sergipe, com massa corporal de aproximadamente 130 ± 30 g e idade média de 100 dias. Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas coletivas, medindo 40x33x17 cm, com tampa de grade metálica, por onde a água e ração balanceada (marca Purina Labina) foram fornecidas *ad libidum*. As gaiolas eram forradas com maravalha, a qual era trocada três vezes por semana. A temperatura era mantida em 22° C, com período de claro e escuro de 12 horas (conforme orientação do biotério).

3.4 ESTUDO LABORATORIAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. No grupo 0 (controle negativo), não foi realizada nenhuma intervenção, somente sendo feita a troca de água e ração. No grupo 1 (controle positivo), metade das ratas foram submetidas à aplicação de 4NQO na língua por nove semanas e a outra metade por um período de dezesseis semanas. No grupo 2, subdividido em grupos 2A e 2B, além da aplicação de 4NQO por nove semanas (grupo 2A) e dezesseis semanas (grupo 2B), as ratas foram submetidas a uma incisão no bordo lateral direito de língua. Por fim, no grupo 3, subdividido em grupos 3A e 3B, as ratas foram submetidas à administração de corticosteroide após aplicação de 4NQO por nove

semanas (grupo 3A) e dezesseis semanas (grupo 3B). Os procedimentos realizados em cada um dos grupos são resumidos no quadro abaixo:

Quadro 1: Procedimentos realizados em cada grupo de animais.

Grupos (nº de animais)		4NQO	Espera	E.I.	Corticoide	Espera após E.I./corticoide	Eutanásia
Grupo 0 (3)		-	-	-	-	-	33 s
Grupo 1 (6)	1A	9 s	-	-	-	-	15 s
	1B	16 s	-	-	-	-	33 s
Grupo 2 (12)	2A	9 s	2 s	2 s	-	2 s	15 s
	2B	16 s	2 s	2s	-	13 s	33 s
Grupo 3 (12)	3A	9 s	2 s	-	2 s	2 s	15 s
	3B	16 s	2s	-	2 s	13 s	33 s

E.I.: Estímulo inflamatório provocado por incisão no bordo lateral direito da língua; Espera: Período em que não foi realizada nenhuma intervenção animais. s: semanas;

3.4.1 APLICAÇÃO DO CARCINÓGENO

O carcinógeno utilizado foi o 4NQO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluído em propilenoglicol (veículo oleoso) numa concentração de 0,7%^{13,14}. Depois de preparado, o recipiente contendo a substância era envolvido em papel alumínio, identificado e acondicionado em geladeira a 4°C. O material era retirado da geladeira e transportado num isopor com gelo até a bancada de trabalho a fim de se manter a temperatura do carcinógeno. Todas as línguas foram fotografadas previamente à primeira aplicação do carcinógeno, sob luz natural, sempre pelo mesmo operador e utilizando-se a câmera fotográfica Nikon 5100.

O carcinógeno foi aplicado três vezes por semana, sempre em dias alternados, permanecendo as ratas cinco horas sem beber água após a aplicação, a fim de aumentar o contato da substância com a língua dos animais. O procedimento de aplicação requereu pelo menos dois operadores, de tal forma que um imobilizava o animal, e o outro fazia a abertura da boca com auxílio de uma pinça, secava a língua com cotonete e pincelava 100 µl da droga previamente agitada no dorso da língua, com auxílio de um pincel 3-0. Cada grupo de animais possuía um pincel exclusivo, sendo esse desinfetado com álcool 70° entre as aplicações. Os

procedimentos foram feitos cuidadosamente, de forma a não causar injúrias aos animais (Anexo B). As bancadas utilizadas eram cuidadosamente forradas e o papel descartado em lixo contaminado.

3.4.2 ESTÍMULO INFLAMATÓRIO E ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTEROIDE

Após o término da aplicação de 4NQO, foram realizados os seguintes procedimentos:

- Grupos 2A e 2B: após aplicação de 4NQO na língua dos animais por nove semanas (grupo 2A) e dezesseis semanas (grupo 2B), esperou-se um período de 2 semanas e realizou-se uma pequena incisão no lado direito do dorso da língua dos animais, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11. Apenas um único operador realizou o procedimento em todos os animais.

- Grupos 3A e 3B: após aplicação de 4NQO na língua dos animais por nove semanas (grupo 3A) e dezesseis semanas (grupo 3B), esperou-se um período de 2 semanas, foi feita administração de corticoide dentro da cavidade oral dos animais. Para isso, utilizou-se a solução de fosfato sódico de prednisolona. Com o auxílio de uma pipeta calibrada, foi administrada uma dose de 1 mg/kg ($\pm 78\mu\text{L}$ -conforme bula) de corticoide na cavidade oral de cada animal previamente imobilizado. A imobilização dos animais ocorreu conforme descrição feita para pincelamento de 4NQO. As aplicações foram realizadas durante quatorze dias consecutivos, sempre no período matutino, a fim de não haver interferência com o eixo hipófise-hipotálamo-adrenais. Apenas um único operador realizou o procedimento em todos os animais (Anexo B).

3.4.3 COLETA DE SANGUE, EXCISÃO DA LÍNGUA E ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a incisão (grupos 2A e 2B) e administração de corticosteroide (grupos 3A e 3B), esperaram-se mais duas ou treze semanas (a depender do grupo) e, ao final desse período, as ratas foram sacrificadas por punção cardíaca sob anestesia (Tiopental, 100mg/Kg, intraperitoneal) e o sangue periférico coletado para posterior análise de IL-2 e IL-10 por meio de ensaio imunoenzimático. Após coleta do sangue, as línguas dos animais foram excisadas com auxílio de pinça clínica e bisturi, examinadas sob luz natural e inseridas em recipientes devidamente identificados, contendo solução de formol a 10%. Além disso, as línguas foram

novamente fotografadas, a fim de verificar o aparecimento de lesões classificadas como placas brancas, placas eritematosas e lesões verrucosas.

3.4.4 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o período de 48 horas, as línguas foram seccionadas ao meio, processadas e incluídas em parafina. Os blocos foram seccionados em cortes de 5µm e posteriormente corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada por dois patologistas calibrados e sem conhecimento da classificação das amostras por grupos, para detecção de alterações patológicas. As hiperplasias e displasias foram classificadas com base na Classificação de Smith & Pindborg (1969). Além disso, foi feita avaliação do infiltrado inflamatório, de forma qualitativa, classificando-o em leve a moderado (LM) ou moderado a severo (MS). A Classificação de Smith & Pindborg, utilizada para descrição dos resultados deste estudo está apresentada nos quadros abaixo (quadros 2 e 3).

Quadro 2: Critérios usados para avaliação das alterações histológicas, de acordo com classificação de Smith e Pindborg (1969)

ALTERAÇÕES	AUMENTO	ESCORES
Projeções em gota	10X	0/2/4
Estratificação irregular	10x	0/2/6
Queratinização abaixo da camada de queratina	10X	0/2/5
Hiperplasia da camada basal	10X	0/1/3
Perda de adesão intercelular	10X	0/1/4
Perda de polaridade	10X	0/2/6
Hipercromatismo nuclear	10X	0/2/5
Relação núcleo/citoplasma alterada	40X	0/2/6
Anisocitose e anisocariose	40X	0/2/6
Pleomorfismo celular e nuclear	40X	0/2/6

Atividade mitótica	40X	0/1/5
Nível de atividade mitótica (localização)	40X	0/3/10
Mitoses atípicas	40X	0/6/10

1º escore: ausência de alteração; 2º escore: pouca alteração; 3º escore: muita alteração.

Quadro 3: Cálculo do Grau de Displasia Epitelial, de acordo com classificação de Smith e Pindborg (1969)

ESCORES	GRAUS
0-10	Hiperplasia
11-25	Displasia Leve
26-45	Displasia Moderada
46-75	Displasia severa ou Carcinoma <i>in situ</i>

3.4.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

O sangue periférico coletado foi utilizado para avaliação de IL-2 e IL-10 no soro dos animais por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Os kits para quantificação de IL-2 e IL-10 utilizados nesse estudo foram adquiridos através do laboratório Elabscience (Wuhan,China). O protocolo seguido para a realização do teste ELISA foi o método do sanduíche (método direto). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante.

3.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística foi realizada a partir do software Bioestat versão 5.3. Além da análise descritiva, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para comparação entre os escores de Pindborg e entre as concentrações de IL-2 e IL-10 nos diferentes grupos, adotando-se nível de significância de 5%. O Pós-teste de Dunn foi utilizado para verificar quais foram os grupos responsáveis pela diferença estatisticamente significativa encontrada entre os escores microscópicos.

4 RESULTADOS

INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA CARCINOGENESE ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL

(Artigo formatado para submissão na revista *Ciência e Saúde Coletiva*, de acordo com as normas do Anexo C)

Leite DP¹; Tavares², DS; Piva, MR³

1Mestre em Odontologia pela Universidade Federal de Sergipe

2Professora do Departamento de Educação em Saúde da Universidade Federal de Sergipe

3 Professora do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe

Autor para correspondência

Danielle Prado Leite, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Hospital Universitário, UFS - Universidade Federal de Sergipe, Rua Cláudio Batista, s/n, Bairro Sanatório, 49060-100 Aracaju - SE, Brasil, e-mail: danielle.pradoleite@gmail.com

Resumo

Introdução: O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é o tumor maligno mais comum da cavidade oral e pode se manifestar como uma úlcera, uma lesão exofítica ou um nódulo de consistência variável em qualquer parte da boca, sendo a língua o sítio mais acometido. Existem evidências de que a inflamação, provocada pelo processo de reparo decorrente de uma biópsia incisional ou de traumas semelhantes, pode estimular a transformação e/ou progressão das células tumorais, e que é real a possibilidade de promoção do crescimento tumoral acarretado pela resposta inflamatória e pelo processo de reparo.

Objetivo: Avaliar a influência da inflamação no processo de carcinogênese oral através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática. **Material e Método:** Foi realizado um estudo experimental em ratas Wistar subdivididas em grupos controle negativo (grupo 0), controles positivos (1A e 1B), grupos submetidos a estímulo inflamatório (2A e 2B) e grupos submetidos à administração de corticosteroide (3A e 3B), em que os grupos 1A, 2A e 3A foram induzidos por 15 semanas e os grupos 1B, 2B e 3B por 33 semanas, através do pincelamento de 4NQO a 0,7% diluído em propilenoglicol na língua dos animais. Estudo

macroscópico e análise histológica foram realizados para caracterização das lesões desenvolvidas, além de ensaio imunoenzimático para avaliação das interleucinas 2 e 10 no desenvolvimento e progressão da carcinogênese oral. **Resultado:** A análise macroscópica revelou que mucosa de aspecto esbranquiçado foi observada em todos os animais submetidos à aplicação de 4NQO. Lesões brancas e/ou placas eritematosas foram encontradas em todos os grupos, com predomínio entre os animais induzidos por mais semanas. Lesões exofíticas foram observadas somente em um animal do grupo 1A, um animal do grupo 1B e dois animais do grupo 2B. O escore médio de displasia epitelial foi de 30,3 (1A), 51,0 (1B), 29,8 (2A), 41,8 (2B), 30,8 (3A) e 34,0 (3B), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos 1A x 1B, 1B x 2B e 1B x 3B. Com relação às concentrações de IL-2 e IL-10, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém houve um aumento visível da IL-10 no grupo 1A, estágio inicial de transformação tumoral, sugerindo que o aumento de IL-10 possa interferir nessa transformação. Avaliando a IL-2 entre os grupos A e B (15 e 33 semanas de indução, respectivamente), notou-se uma diferença mais acentuada entre os grupos 2A e 2B (estímulo inflamatório), enquanto que, entre os grupos 3A e 3B (corticosteroide), a concentração permaneceu praticamente inalterada. **Conclusão:** O estímulo inflamatório não foi suficiente para causar alteração histológica, mas o uso do corticosteroide interferiu na progressão tumoral; é necessária a realização de novos estudos que avaliem as concentrações de IL-2 e IL-10 em uma amostra maior e/ou dentro das lesões, relacionando-os com as concentrações no sangue periférico, para confirmação dos achados.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Inflamação; Corticosteroide; Citocinas.

Abstract

Introduction: The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity and can manifest itself as an ulcer, one exophytic lesion or a nodule of varying consistency anywhere in the mouth, being tongue the most committed place. There is evidence that inflammation caused by the repair process due to an incisional biopsy or similar trauma, can stimulate the transformation and/or progression of tumor cells, and that is real the possibility of promoting tumor growth called out by the inflammatory response and the repair process. **Objective:** Evaluate the influence of inflammation in the process of oral carcinogenesis through macroscopical and histological analysis and enzyme immunoassay. **Material and Method:** An experimental study was conducted in Wistar rats subdivided into

negative control group (group 0), positive control groups (1A and 1B), groups submitted to inflammatory stimulus (2A and 2B) and groups subject to the administration of corticosteroids (3A and 3B), in which groups 1A, 2A and 3A were induced for 15 weeks and the groups 1B, 2B and 3B for 33 weeks, by brushing the 4NQO diluted in 0.7% propylene glycol on the tongue of the animals. Macroscopic and histological studies were performed to characterize the lesions, besides enzyme immunoassay to evaluate interleukins 2 and 10 in the development and progression of oral carcinogenesis. **Results:** Macroscopic analysis revealed that whitish mucosa was observed in all animals submitted to the application of 4NQO. White and/or erythematous plates were found in all groups, with high prevalence between animals induced for more weeks. Lesions in later stages were found only in one animal in 1A group, one animal in 1B group and two animals in 2B group. The mean score of epithelial dysplasia was 30.3 (1A), 51.0 (1B), 29.8 (2A), 41.8 (2B), 30.8 (3A) and 34.0 (3B), with difference statistically significant ($p < 0.05$) between 1A x 1B, 1B x 2B and 1B x 3B. Concerning to IL-2 and IL-10 concentrations, there was no difference statistically significant between groups ($p > 0.05$), but there was a visible increase in IL-10 levels in 1A group, early stage of tumor transformation, suggesting that IL-10 increase can interfere in this transformation. Evaluating IL-2 between A and B groups (15 and 33 weeks of indução, respectively), it was noticed a more marked difference between the groups 2A and 2B (inflammatory stimulus), while between groups 3A and 3B (corticosteroids), the concentration remained virtually unchanged. **Conclusion:** It is suggested that the inflammatory stimulus is not sufficient to cause any histological alteration, but the use of corticosteroids appears to interfere with tumor progression; it is necessary to carry out new studies to evaluate the IL -2 and IL-10 concentrations in a larger sample and/or within the lesions, relating them to the concentrations in the peripheral blood.

Key words: Carcinoma, squamous cells; Inflammation; Corticosteroids; Cytokines.

Introdução

O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é o tumor maligno mais comum da cavidade oral e pode se manifestar como uma úlcera, uma lesão exofítica ou um nódulo de consistência variável em qualquer parte da boca, sendo a língua o sítio intraoral mais comum, responsável por cerca de 40% dos casos^{1,2}. A incidência do CCEO é em torno de 8,2/100.000 casos/ano entre os homens e 2,8/100.000 casos/ano entre as mulheres e normalmente se

manifesta entre as 5^a, 6^a e 7^a décadas de vida, embora o número de pacientes acometidos com menos de 45 anos esteja aumentando. No Brasil, foram previstos 576 mil novos casos da doença para o ano de 2014, apresentando um aumento de 10% com relação ao levantamento realizado no período anterior³.

Por cerca de dois milênios, uma relação causal entre inflamação e câncer foi suspeita. Galen foi o primeiro a observar essa relação e, mais tarde, no século XIX, Rudolf Virchow demonstrou a presença de leucócitos em tecidos malignos e afirmou que os tumores surgem a partir de regiões de inflamação crônica⁴.

As citocinas são um importante grupo de proteínas que regulam e medeiam a inflamação e a angiogênese. O crescimento do tumor, invasão e metástase são facilitados quando há uma desregulação na sua produção. As citocinas incluem interleucinas, fatores de necrose tumoral e certos fatores de crescimento. Uma série de estudos de associação genética recentemente investigou a correlação entre polimorfismos de DNA em genes funcionais de citocinas e carcinomas de cabeça e pescoço⁶.

Além disso, apesar do grande número de estudos envolvendo a participação das interleucinas na progressão tumoral, o papel de algumas delas ainda não está verdadeiramente claro. A interleucina-2 (IL-2) é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T, induzindo ciclo celular para células T não-ativadas e expansão clonal de células T ativadas. É um agente proliferativo antígeno inespecífico. Ativa ainda células B, necessitando para tal de fatores adicionais, como IL-4. Estimula a proliferação e ativação de células CD8+, tendo assim atividade antitumoral⁷.

A interleucina-10 (IL-10), primeiro reconhecida pela sua capacidade para inibir a ativação de células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina multifuncional com diversos efeitos sobre a maioria dos tipos de células hematopoiéticas. A principal função de rotina de IL-10 parece ser para limitar e, finalmente, terminar respostas inflamatórias. Além destas atividades, a IL-10 regula o crescimento e / ou diferenciação de células B, células NK, células T auxiliares e citotóxicas, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos, e células endoteliais⁹.

Com relação ao diagnóstico do câncer oral, a análise histopatológica realizada após o procedimento de biópsia incisional atua como uma importante ferramenta, podendo indicar o grau de diferenciação e o tipo celular envolvido, servindo de parâmetro para a escolha do melhor tratamento. Existem evidências de que a inflamação, provocada pelo processo de

reparo decorrente de uma biópsia incisional ou de traumas semelhantes, pode estimular a transformação e/ou progressão das células tumorais, e que é real a possibilidade de promoção do crescimento tumoral acarretado pela resposta inflamatória e pelo processo de reparo^{11,12}. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da inflamação no processo de carcinogênese oral induzida pelo 4NQO através de análise macroscópica, histológica e imunoenzimática.

Metodologia

O presente estudo foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob protocolo nº 33/2013.

- **Descrição da amostra**

A amostra foi constituída por 33 ratas Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Sergipe, com massa corporal de aproximadamente 130±30g e idade média de 100 dias. Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas coletivas, medindo 40x33x17 cm, com tampa de grade metálica, por onde a água e ração balanceada (marca Purina Labina) foram fornecidas *ad libidum*. A temperatura era mantida em 22° C, com período de claro e escuro de 12 horas (conforme orientação do biotério).

- **Estudo Laboratorial**

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. No grupo 0 (controle negativo), não foi realizada nenhuma intervenção, somente sendo feita a troca de água e ração. No grupo 1 (controle positivo), metade das ratas foram submetidas à aplicação de 4NQO na língua por nove semanas e a outra metade por um período de dezesseis semanas. No grupo 2, subdividido em grupos 2A e 2B, após aplicação de 4NQO por nove semanas (grupo 2A) e dezesseis semanas (grupo 2B), as ratas foram submetidas a uma incisão no bordo lateral direito de língua. Por fim, no grupo 3, subdividido em grupos 3A e 3B, as ratas foram submetidas à administração de corticosteroide por duas semanas após aplicação de 4NQO por nove semanas (grupo 3A) e dezesseis semanas (grupo 3B).

- **Aplicação do carcinógeno**

Para aplicação do carcinógeno químico, foi utilizado o 4NQO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluído em propilenoglicol (veículo oleoso), em uma concentração de 0,7%^{13,14}. Depois de preparado, o recipiente contendo a substância era envolvido em papel alumínio, identificado e acondicionado em geladeira a 4°C. Todas as línguas foram fotografadas previamente à primeira aplicação do carcinógeno, sob luz natural, sempre pelo mesmo operador e utilizando-se a câmera fotográfica Nikon 5100.

O carcinógeno foi aplicado três vezes por semana, sempre em dias alternados, permanecendo as ratas cinco horas sem beber água após a aplicação, a fim de aumentar o contato da substância com a língua dos animais. O procedimento de aplicação requereu dois operadores, de tal forma que um imobilizava o animal, e o outro fazia a abertura da boca com auxílio de uma pinça, secava a língua com cotonete e pincelava 100 µl da droga previamente agitada no dorso da língua, com auxílio de um pincel 3-0. Cada grupo de animais possuía um pincel exclusivo, sendo esse desinfetado com álcool 70° entre as aplicações. Os procedimentos foram feitos cuidadosamente, de forma a não causar injúrias aos animais.

- **Estímulo inflamatório e administração de corticosteroide**

Após aplicação de 4NQO na língua dos animais por nove semanas (grupos 2A) e dezesseis semanas (grupo 2B), esperou-se um período de duas semanas e realizou-se uma pequena incisão no lado direito do dorso da língua dos animais pertencentes a esses grupos, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11. Já nos grupos grupo 3A e 3B, após as aplicações por nove e dezesseis semanas, respectivamente, passadas duas semanas, foi administrada durante quatorze dias consecutivos uma dose de 1 mg/kg ($\pm 78\mu\text{L}$ - conforme bula) de fosfato sódico de prednisolona na cavidade oral de cada animal previamente imobilizado. As aplicações foram realizadas sempre no período matutino, a fim de não haver interferência com o eixo hipófise-hipotálamo-adrenais. O resumo dos procedimentos realizados em cada grupo de animais está apresentado no quadro 1.

Quadro 1: Procedimentos realizados em cada grupo de animais.

Grupos (nº de animais)		4NQO	Espera	E.I.	Corticoide	Espera após E.I./corticoide	Eutanásia
Grupo 0 (3)		-	-	-	-	-	33 s
Grupo 1	1A	9 s	-	-	-	-	15 s

(6)	1B	16 s	-	-	-	-	33 s
Grupo 2	2A	9 s	2 s	SIM	-	4 s	15 s
(12)	2B	16 s	2 s	SIM	-	15 s	33 s
Grupo 3	3A	9 s	2 s	-	SIM	4 s	15 s
(12)	3B	16 s	2s	-	SIM	15 s	33 s

E.I.: Estímulo inflamatório provocado por incisão no bordo lateral direito da língua; Espera: Período em que não foi realizada nenhuma intervenção animais. s: semanas.

- **Coleta de sangue, excisão da língua e análise macroscópica**

Após a incisão (grupos 2A e 2B) e administração de corticosteroide (grupos 3A e 3B), esperaram-se mais quatro ou quinze semanas (a depender do grupo) e, ao final desse período, as ratas foram sacrificadas por punção cardíaca sob anestesia (Tiopental, 100mg/Kg, intraperitoneal) e o sangue periférico coletado. Após coleta do sangue, as línguas dos animais foram excisadas com auxílio de pinça clínica e bisturi, examinadas sob luz natural, a fim de verificar o aparecimento de lesões classificadas como placas brancas, placas eritematosas e lesões verrucosas, novamente fotografadas e inseridas em recipientes devidamente identificados, contendo solução de formol a 10%.

- **Processamento das peças e análise histopatológica**

Após o período de 48 horas, foi realizado o processamento das peças conforme protocolo padrão. A análise histopatológica foi realizada por dois patologistas calibrados e sem conhecimento da classificação das amostras por grupos, para detecção de alterações patológicas. As hiperplasias e displasias foram classificadas com base na Classificação de Smith & Pindborg (1969). Além disso, foi feita avaliação do infiltrado inflamatório, de forma qualitativa, classificando-o em leve a moderado (LM) ou moderado a severo (MS). A Classificação de Smith & Pindborg está apresentada nos quadros 2 e 3.

Quadro 2: Critérios usados para avaliação das alterações histológicas, de acordo com classificação de Smith e Pindborg.

ALTERAÇÕES	AUMENTO	SCORES
Projeções em gota	10X	0/2/4
Estratificação irregular	10x	0/2/6

Queratinização abaixo da camada de queratina	10X	0/2/5
Hiperplasia da camada basal	10X	0/1/3
Perda de adesão intercelular	10X	0/1/4
Perda de polaridade	10X	0/2/6
Hipercromatismo nuclear	10X	0/2/5
Relação núcleo/citoplasma alterada	40X	0/2/6
Anisocitose e anisocariose	40X	0/2/6
Pleomorfismo celular e nuclear	40X	0/2/6
Atividade mitótica	40X	0/1/5
Nível de atividade mitótica	40X	0/3/10
Mitoses atípicas	40X	0/6/10

1º escore: ausência de alteração; 2º escore: pouca alteração; 3º escore: muita alteração.

Quadro 3: Cálculo do Índice de Displasia Epitelial, de acordo com classificação de Smith e Pindborg (1969)

ESCORES	GRAUS
0-10	Hiperplasia
11-25	Displasia Leve
26-45	Displasia Moderada
46-75	Displasia severa ou Carcinoma <i>in situ</i>

O sangue periférico coletado foi utilizado para avaliação de IL-2 e IL-10 no soro dos animais por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Os kits para quantificação de IL-2 e IL-10 utilizados nesse estudo foram adquiridos através do laboratório Elabscience (Wuhan,China). O protocolo seguido para a realização do teste ELISA foi o método do sanduíche (método direto). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. A análise estatística foi por meio do software Bioestat, versão 5.3. Além da análise descritiva, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para comparação entre os escores de Pindborg e entre as concentrações de IL-

2 e IL-10 nos diferentes grupos, adotando-se nível de significância de 5%. O Pós-teste de Dunn foi utilizado para verificar quais foram os grupos responsáveis pela diferença estatisticamente significativa encontrada entre os escores microscópicos.

Resultados

Macroscopicamente, as línguas das ratas do grupo 0 (controle negativo) não apresentaram alterações, pois não foram submetidas a nenhum tipo de procedimento. Mucosa de aspecto esbranquiçado foi observada em todos os animais submetidos à aplicação de 4NQO. Dentre os animais do grupo 1A, apenas um deles apresentou lesão clínica, sendo essa verrucosa. No grupo 1B, foram detectadas lesões de um ou mais tipos em todos os animais. As lesões de dorso geralmente eram placas brancas, e a borda lateral e ventre lingual foram afetados por placas eritematosas em sua maioria, apesar de um animal ter apresentado lesão verrucosa no ventre lingual. No grupo 2A, duas ratas apresentaram lesões esbranquiçadas no dorso ou ventre lingual, sem a presença de lesões verrucosas ou placas eritematosas. Já os ratos do grupo 2B apresentaram lesões esbranquiçadas, verrucosas ou placas eritematosas. Com relação aos grupos 3A e 3B (submetidos à administração de corticosteroide), em todos os ratos apareceram lesões esbranquiçadas no dorso ou ventre lingual, sem a presença de lesões verrucosas ou placas eritematosas.

Com relação a lesões exofíticas, essas foram observadas em uma rata do grupo 1A (9 semanas de 4NQO), uma rata do grupo 1B (16 semanas de 4NQO) e duas ratas do grupo 2B (16 semanas de 4NQO + biópsia).

No que concerne à classificação das displasias, de acordo com os critérios adotados por Smith & Pindborg, as línguas das ratas do grupo 0 não apresentaram alterações histológicas após as 33 semanas de experimento. O grupo 1A, com 15 semanas de indução, apresentou escores entre 25 a 37 (média: 30,3). Portanto, a displasia epitelial oral (DEO) nesse grupo variou entre leve a moderada. O grupo 1B, com 33 semanas de indução, apresentou escores de DEO mais altos, com uma média de 51,0. No grupo 2A, com 15 semanas de indução e submetidos a estímulo inflamatório, os escores variaram entre 23 e 35, ou seja, a DEO variou entre leve a moderada, com uma média de escore de 29,8. No grupo 2B, com 33 semanas de indução e estímulo inflamatório, os escores variaram entre 34 e 52 (média: 41,8), apresentando assim, casos de DEO moderada e severa. O grupo 3A, com 15 semanas de indução e administração de corticosteroide, apresentou escores entre 18 e 43 (média: 30,8), valores bastante semelhantes aos encontrados para o grupo 3B (33 semanas de

indução + corticoesteroide), que apresentou uma média de 34,0. A análise estatística acusou diferença significativa entre os grupos 1A x 1B, 1B x 2B e 1B x 3B ($p < 0,05$). Tais dados indicam que o estímulo inflamatório não apresentou efeito sobre as alterações celulares, e, ao contrário do esperado, reduziu os valores dos escores histológicos entre o grupo controle 1B e teste 2B. No que concerne à administração de corticosteroide, embora nos grupos controle (1A) e teste (3A), submetidos a 15 semanas de indução, não tenha havido diferença entre os escores (30,3 x 30,8), notou-se uma redução significativa nos escores dos grupos submetidos a 33 semanas de indução (51,0 x 34,0), indicando que o uso da prednisolona está associado à redução dos escores histológicos. Com relação ao infiltrado inflamatório, observou-se que não houve diferenças significantes entre os grupos estudados. Os resultados da análise histológica estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Escores microscópicos, de acordo com classificação de Smith e Pindborg (1969).

GRUPOS	4NQO	R1	R2	R3	R4	R5	R6	MÉDIA/GD	I.I.
0	-	0	0	0	0	0	0	0	Ausente
1A	9 s	25	29	37	-	-	-	30,3/DM ^a	LM
1B	16 s	52	51	50	-	-	-	51,0/DS ^{a,b,c}	LM
2A	9 s	23	31	25	35	35	30	29,8/DM	LM
2B	16 s	38	52	34	40	45	x	41,8/DM ^b	MS
3A	9 s	22	18	43	29	38	35	30,8/DM	MS
3B	16 s	33	29	35	30	31	46	34,0/DM ^c	LM

s: semanas; x: rato morto durante experimento; GD: grau de displasia; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; I.I.: infiltrado inflamatório; LM: leve a moderado; MS: moderado a severo. Letras iguais representam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

No que se refere ao ensaio imunoenzimático, a análise estatística não acusou diferenças significantes entre os grupos para as concentrações de IL-2 e IL-10 ($p > 0,05$), o que pode ter ocorrido pelo tamanho da amostra estudada. Ainda que sem diferença do ponto de vista estatístico, alguns achados mostraram-se interessantes.

As concentrações de IL-2 no soro dos animais apresentaram-se mais elevadas nos grupos A (submetidos a apenas 15 semanas de indução) quando comparadas às concentrações

obtidas para os grupos B (submetidos a 33 semanas de indução), o que sugere que a IL-2 está presente em maiores concentrações nos estágios iniciais da carcinogênese.

Com relação à concentração de IL-2, o grupo 0 apresentou uma média de 8,79pg/ml, com os grupos 1A e 1B (grupos sem estímulo) apresentando valores bem semelhantes (10,61pg/ml e 8,22pg/ml, respectivamente). Por outro lado, nota-se uma elevação significativa da concentração de IL-2 nos grupos submetidos a estímulo inflamatório e à administração de corticosteroide (2A, 2B, 3A e 3B).

No que concerne à IL-10, houve um aumento acentuado de concentração no grupo submetido a apenas 15 semanas de indução sem qualquer estímulo (grupo 1A-16,68pg/ml), quando comparado aos demais grupos, que apresentaram valores muito próximos aos do controle negativo. Observou-se também que os valores de IL-10 sempre se apresentaram mais elevados nos grupos submetidos a menos semanas de indução (grupos A), o que sugere um papel relevante dessa interleucina nas fases iniciais da carcinogênese oral.

O gráfico 1 apresenta as concentrações de IL-2 e IL-10 em cada grupo, calculadas a partir dos valores de absorbância encontrados após leitura das placas. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$).

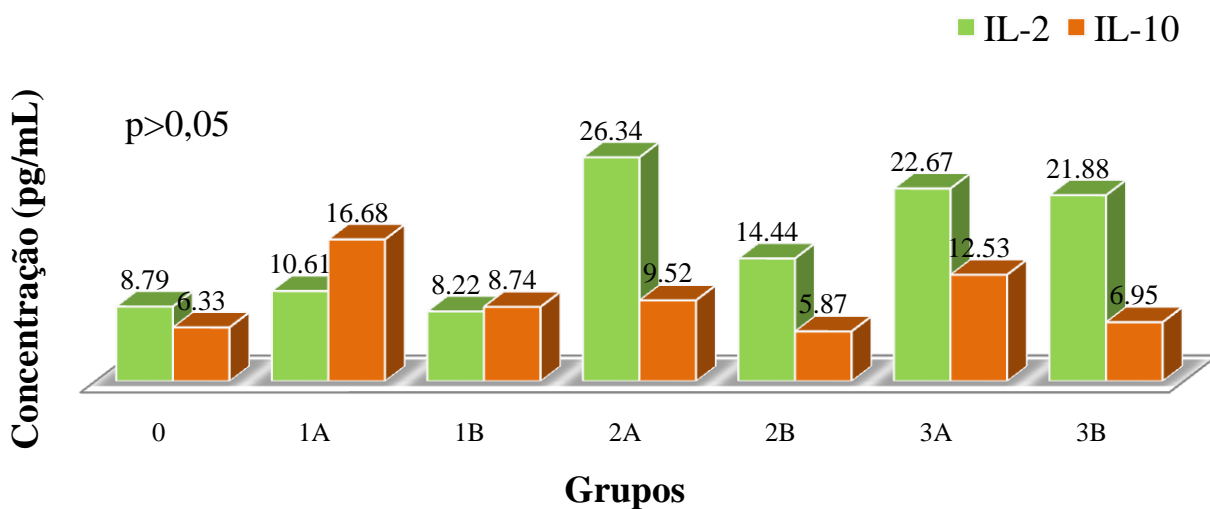


Gráfico 1: Concentração de IL-2 e IL-10 por grupo

Discussão

As chances de cura do câncer estão diretamente relacionadas ao diagnóstico precoce. Mesmo assim, a prevenção é a única forma segura de detê-lo. A detecção e o tratamento das

lesões potencialmente malignas (LPM) é a forma mais eficaz de prevenção, porém, a presença de sinais e/ou sintomas sistêmicos, em pessoas expostas a fatores de risco, podem preceder a transformação dessas LPM.

No que se refere à análise macroscópica das línguas dos ratos, os resultados encontrados corroboram com os estudos de vários autores¹⁵⁻¹⁷, os quais afirmam que a sequência de evolução das lesões geralmente se inicia com manchas esbranquiçadas e, com a progressão da carcinogênese oral, alterações como lesões papilomatosas e úlceras surgem. Tal sequência foi observada neste experimento.

Pode-se notar que lesões clínicas exofíticas raramente foram observadas, tendo a maioria dos animais apresentado somente alterações na coloração, como manchas esbranquiçadas, uma vez que o tempo de indução, de acordo com Gannot *et al*¹⁸ e Vered *et al*¹⁹, foi insuficiente, sendo necessário um tempo de indução de no mínimo 20 a 35 semanas para aparecimento de lesões macroscópicas mais avançadas, tais como as de aspecto verrucoso ou papilomatoso. É importante ressaltar que o período de indução corresponde ao tempo de aplicação do 4NQO mais o período de espera. Sendo assim, a presença de lesões mais desenvolvidas não era esperada nos animais dos grupos 1A, 2A e 3A, que foram submetidos apenas a 15 semanas de indução. Entretanto, tais achados discordam do estudo de Ribeiro e Salavadori²⁰, que encontraram na superfície dorsal da língua de ratos áreas brancas e ásperas após 12 semanas de indução com 4NQO.

Com relação à análise histológica, a diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os escores do grupos 1A (15 semanas de indução) e 1B (33 semanas de indução), indica que a aplicação da substância por dezesseis semanas foi capaz de elevar significativamente os valores dos escores histológicos. A diferença significativa, porém negativa, entre os escores dos grupos 1B e 2B indica que o estímulo inflamatório não foi suficiente para causar alterações histológicas indicativas de progressão tumoral, diferente do que se imaginava. Por outro lado, a administração de corticosteroide foi capaz de reduzir os escores histológicos, de acordo com o esperado. Os achados histopatológicos, na maioria dos casos, demonstraram coerência com os achados macroscópicos, uma vez que os ratos que apresentaram lesões de aspecto verrucoso ou papilomatoso, pertenciam aos grupos que foram submetidos a 33 semanas de indução e também apresentaram maiores valores de escore microscópico.

Os resultados do ensaio imunoenzimático revelaram que as concentrações de IL-2 no soro dos animais apresentaram-se mais elevadas nos grupos A (grupos submetidos a apenas 15 semanas de indução), quando comparadas aos grupos B (grupos submetidos a 33

semanas de indução). Embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, esse achado sugere que a IL-2 está presente em maiores concentrações nos estágios iniciais da carcinogênese, em que provavelmente exerce um papel antitumoral. De fato, sabe-se que a IL-2 estimula o crescimento e a diferenciação dos linfócitos CD8+, que são as células responsáveis pela primeira defesa antitumoral²¹.

No presente estudo, notou-se um leve aumento da IL-2 no grupo 1A, e um aumento mais acentuado nos grupos 2A e 3A, grupos que sofreram estímulos pró e anti-inflamatórios, respectivamente, indicando que esses estímulos apresentaram repostas semelhantes nesta fase. Embora fosse esperada uma diminuição da IL-2 com o uso do corticosteroide, devido ao seu efeito anti-inflamatório, tal fato não ocorreu, mas os resultados ficaram de acordo com os achados histológicos, que não mostraram alteração significativa entre a quantidade de infiltrado inflamatório dos grupos analisados. Nesse contexto, entra a importância da avaliação qualitativa dos subprodutos da inflamação.

Avaliando-se a IL-2 entre os grupos A e B (15 e 33 semanas de indução, respectivamente), notou-se uma diferença mais acentuada entre os grupos 2A e 2B (estímulo inflamatório), enquanto que, entre os grupos 3A e 3B (corticoide), a concentração permaneceu praticamente inalterada. Ao relacionar tais achados com as alterações clínicas e histológicas encontradas, sugere-se que o estímulo inflamatório não interferiu na progressão tumoral, mas o uso do corticoide parece ter interferido, já que, entre os grupos 3A e 3B, também não foram observadas diferenças entre os escores histológicos, como também entre as alterações clínicas. Essa interferência provavelmente foi no sentido de conter a progressão do tumor.

A imunoterapia do câncer com IL-2 tem demonstrado controle da doença a longo prazo em carcinoma de células renais metastático e melanoma maligno. Com a introdução de novos inibidores de quinase, moléculas imunomoduladoras, citocinas e vacinas para o tratamento do câncer, há um interesse crescente em combinar estas estratégias terapêuticas com IL-2²².

Embora o corticoide seja utilizado como anti-inflamatório, ele atua inibindo fatores de transcrição que regulam a expressão gênica anormal, como também aumenta a transcrição de genes que codificam proteínas anti-inflamatórias, dentre elas a IL-10²³, aqui avaliada.

Sabe-se que a IL-10 tem feedback negativo com células T reguladoras, as quais têm importante papel na manutenção da autotolerância e homeostase ao inibir resposta imunológica²⁴. Logo, a diminuição da IL-10 entre todos os grupos A e B, sugere funções

diferentes dessa citocina nas fases de transformação e progressão tumoral, corroborando com vários estudos^{10,25-27}.

Sendo assim, a IL-10 aumentada, também na fase inicial da carcinogênese, pode clivar a IL-2, provocando uma diminuição dessa última ao longo do tempo, o que poderia explicar o motivo de a concentração de IL-2 ser inferior nos grupos submetidos a mais semanas de indução (grupos B).

No estudo em questão, a concentração de IL-10 foi superior nos grupos sem estímulo (1A e 1B), inclusive com uma relação inversa quando comparada à IL-2, cuja concentração foi inferior nesses mesmos grupos. Já nos grupos com estímulo (2A, 2B, 3A e 3B), a IL-10 apareceu em menores quantidades, talvez por isso a IL-2 apresentou-se aumentada. É possível que a quantidade de corticoide utilizada não tenha sido suficiente para causar imunossupressão, mas tenha interferido na qualidade da resposta inflamatória. Tais resultados sugerem que o corticoide foi importante para impedir a progressão, ainda que temporariamente.

A partir dos resultados apresentados, nota-se que, apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa, não se pode desprezar o aumento da concentração de IL-10 quando se compara o grupo 0 (nenhum procedimento realizado) ao grupo 1A (15 semanas de indução). Sendo assim, a concentração de IL-10 no sangue periférico poderia ser usada como indicador de transformação tumoral. Tal fato, caso comprovado em humanos, poderá beneficiar o diagnóstico precoce do processo de transformação tumoral, uma vez que através de um simples exame de sangue, ao ser constatado um aumento dos níveis de IL-10 no sangue periférico, poder-se-á suspeitar de um processo de carcinogênese, principalmente se o paciente em questão apresentar fator de risco associado. Essa hipótese, se confirmada, será de grande valia na prevenção do câncer, como também no tratamento de pacientes que apresentem lesões potencialmente malignas.

Os resultados deste estudo corroboram com o estudo de Aziz e colaboradores²⁷, que encontraram concentrações de IL-10 na saliva de pacientes com CCEO estatisticamente superiores aos valores encontrados para pacientes saudáveis, o que reafirma o papel crítico exercido pela IL-10 na carcinogênese, que tem seu principal papel na supressão da resposta imune e inflamatória.

A partir das hipóteses do papel da IL-10 na progressão tumoral, nos últimos anos, uma nova modalidade de terapia contra o câncer tem sido estudada, a IL-10 peguilada (PEG IL-10). A PEG IL-10 pode ocupar uma posição única no arsenal terapêutico contra o câncer,

corrigindo tanto a inflamação associada ao tumor quanto a falta de imunidade tumoral de uma só vez. Sendo assim, pode representar um novo caminho terapêutico promissor para o tratamento de pacientes com câncer, ainda que não se saiba exatamente por quais mecanismos a PEG IL-10 age no combate à progressão do câncer²⁹.

Algumas limitações estiveram presentes neste estudo. O fato de a pesquisa ter sido realizada em animais por si só constitui-se um fator limitador da transposição dos resultados para os casos de lesões cancerosas em humanos. Além disso, a quantidade de animais disponibilizados para a realização do estudo, por ser muito pequena, não nos permite concluir com um maior nível de evidência os resultados encontrados. Sugere-se a realização de estudos em humanos com amostras mais relevantes para a comprovação do real papel dessas interleucinas no desenvolvimento da carcinogênese oral, tais como estudos de coortes, em que através da coleta de sangue dos pacientes, seja elaborado um painel de citocinas para análise do desenvolvimento e progressão do câncer.

Outro ponto limitante dentro desse estudo é que os valores de concentração de IL-2 e IL-10 foram obtidos através da quantificação das citocinas no sangue periférico. Grande parte da literatura levantada apresenta dados de pesquisas em que foram quantificadas citocinas dentro da lesão tumoral, e não no sangue periférico, tornando-se difícil a discussão dos resultados encontrados. Entretanto, sabe-se que o sangue periférico pode ser de grande valia para analisar a influência das interleucinas de um ponto de vista sistêmico. Sendo assim, como a presente pesquisa se propôs a realizar tanto o estudo histopatológico quanto o teste imunoenzimático, tornou-se inviável realizar ambos os estudos utilizando-se um material tão exíguo como é a língua dos ratos, optando-se pela análise das interleucinas no sangue periférico. Portanto, sugere-se o desenvolvimento de estudos que possam avaliar as concentrações de IL-2 e IL-10 dentro das lesões, relacionando com os resultados encontrados no sangue periférico, para confirmação dos achados desta pesquisa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Sugere-se que o estímulo inflamatório, antes do aparecimento de lesão clínica, não é suficiente para causar qualquer alteração histológica, mas o uso do corticosteroide parece interferir na progressão tumoral;
- É necessária a realização de novos estudos que possam avaliar as concentrações de IL-2 e IL-10 dentro das lesões, relacionando com os resultados encontrados para o sangue periférico e/ou uma amostra maior para confirmação dos achados desta pesquisa.

6 COMUNICADO DE IMPRENSA

O presente estudo teve como objetivo analisar a influência da inflamação no processo de desenvolvimento e progressão do câncer oral, considerado o sexto tipo de câncer mais comum no mundo. Foi realizado um experimento com ratas em laboratório, a fim de verificar se a inflamação causada por um procedimento de biópsia poderia resultar em uma progressão de uma lesão existente e se a administração de um anti-inflamatório esteroidal (corticoide) poderia atuar freando o desenvolvimento dessa lesão. Além disso, foi realizado um teste imunoenzimático para avaliar o papel das interleucinas 2 e 10 no desenvolvimento do câncer. Como resultados, observamos que o estímulo inflamatório gerado pela biópsia não pareceu ser suficiente para levar à progressão das lesões, e que a administração do corticoide parece ter interferido na progressão das lesões. Além disso, é necessária a realização de novos estudos que possam avaliar as concentrações de IL-2 e IL-10 dentro das lesões, relacionando com os resultados encontrados para o sangue periférico e/ou uma amostra maior para confirmar os achados desta pesquisa.


REFERÊNCIAS

1. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. *Patholog Res Int*. 2011;2011:431246.
2. Watanabe N, Ohkubo T, Shimizu M, Tanaka T. Preneoplasia and carcinogenesis of the oral cavity. *Oncology Discovery*. 2015;3:1-10.
3. Instituto Nacional do Câncer. 2014. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 20 de agosto de 2014.
4. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255):539-45.
5. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, Bubici C, Mossman BT, Pass HI, Testa JR, Franzoso G, Carbone M. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NFkappaB - dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(27):10397-402.
6. Serefoglou Z, Yapijakis C, Nkenke E, Vairaktaris E. Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2008;44(12):1093-9.
7. Cho JH, Kim HO, Kim KS, Yang DH, Surh CD, Sprent J. Unique features of naive CD8+ T cell activation by IL-2. *The Journal of Immunology*. *J Immunol*. 2013;191(11):5559-73.
8. Antony GK, Dudek AZ. Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2010;17(29):3297-302.
9. Benjamin D, Knoblock TJ, Dayton MA. Human B cell interleukin-10 cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukine-10. *Blood*. 1992;80(5):1289-98.
10. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*. 2011;51(2-3):170-82.

11. Tanaka T. Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. 2012;1:1-16.
12. Hobson J, Phani G, Brian S, Dore G, Janice B, Ted J, Mercedes R. Acute inflammation induced by biopsy of mouse mammary tumors promotes the development of metastasis. *Brest Cancer Res Treat*. 2013;139(2):391-401.
13. El-Rouby DH. Histological and immunohistochemical evaluation of the chemopreventive role of lycopene in tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Arch. Oral Biol*. 2011;56(7):664-71.
14. Jiang C, Ye D, Qiu W, Zhang X, Zhang Z, He D, Zhang P, Chen W. Response of lymphocyte subsets and cytokines to Shenyang prescription in Sprague-Dawley rats with tongue squamous cell carcinomas induced by 4NQO. *BMC Cancer*. 2007;5:7-40.
15. Wallenius K, Mathur A, Abdulla M. Effect of different levels of dietary zinc on development of chemically induced oral cancer in rats. *Int J Oral Surg*. 1979;8(1):56-62.
16. Steidler NE, Reade PC. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinolone-1-oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;57(5):524-31.
17. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia—the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995;24(1):53-8.
18. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interacion between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-Nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncol*. 2004;40(3):287-97.
19. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal Myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol*. 2011;43(10):999-1006.
20. Ribeiro DA, Salvadori DMF. Gingival Changes in Wistar Rats after Oral Treatment with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *European Journal Of Dentistry*. 2007;1(3):152-7.
21. Rosenberg SA. IL2: the first effective immunotherapy for human cancer. *The Journal of Immunology*. 2014;192:5451-8.
22. Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, Galon J, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology*. 2012;1(4):493-506.

23. Fernandes AM, Valera FC, Anselmo-Lima WT. Mecanismos de ação dos corticosteroides na polipose rinossinusal. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2008;74(2):279-83.
24. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*, 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
25. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol.* 2005;78(5):1043-51.
26. Oftin M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Imuunol Res.* 2014;2(3):194-9.
27. Piva MR, De Souza LB, Martins-Filho PR, Soares RC, De Santana Santos T, De Souza Andrade ES. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part I): Histological grading of malignancy using a binary system. *Oncology letters.* 2011;2(6):1225-31.
28. Aziz S, Ahmed SS, Ali A, Khan FA, Zulfiqar G, Iqbal J, Khan AA, Shoaib M. Salivary immunosuppressive cytokines IL-10 and IL-13 are significantly elevated in oral squamous cell carcinoma patients. *Cancer Invest.* 2015.33;7:318-28.
29. Teng MWL, Darcy PK, Smyth MJ. Stable IL-10: A new therapeutic that promotes tumor immunity. *Cancer Cell.* 2011;20(6):691-3.

ANEXO A




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "A INFLUÊNCIA DA BIÓPSIA INCISIONAL NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL EM RATOS – INVESTIGAÇÃO DA CITOPATOLOGIA COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO." Sob coordenação da Profª.Drª. Rosilene Calazans Soares (protocolo CEPA 33/2013) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 23/10/2013.

São Cristóvão, 24 de outubro de 2013.


Prof. Drª. FLÁVIA TEIXEIRA SILVA
Coordenadora do CEPA/UFS

ANEXO B



Figura 1: Imobilização do animal.

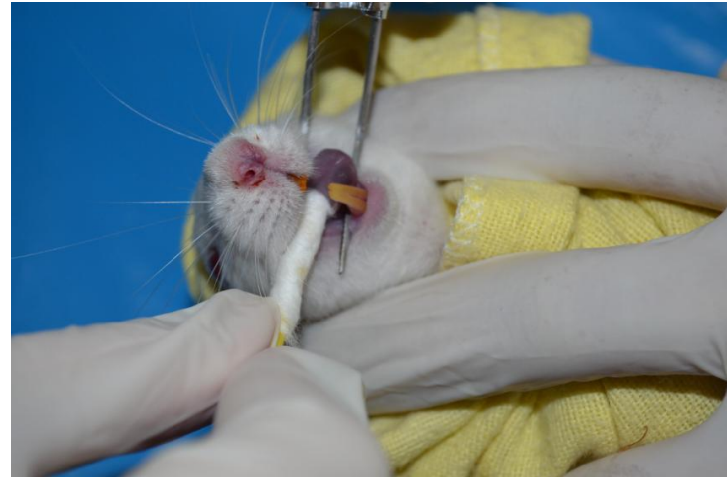


Figura 2: Abertura da boca e secagem da língua do animal.



Figura 3: Aplicação do carcinógeno.

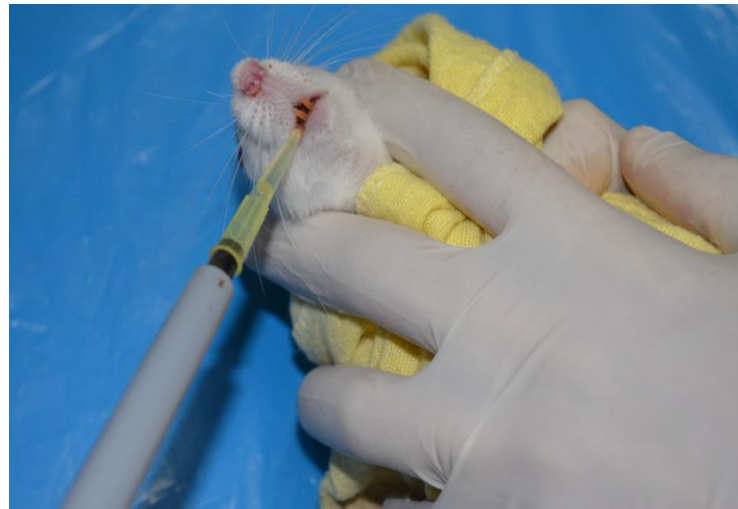
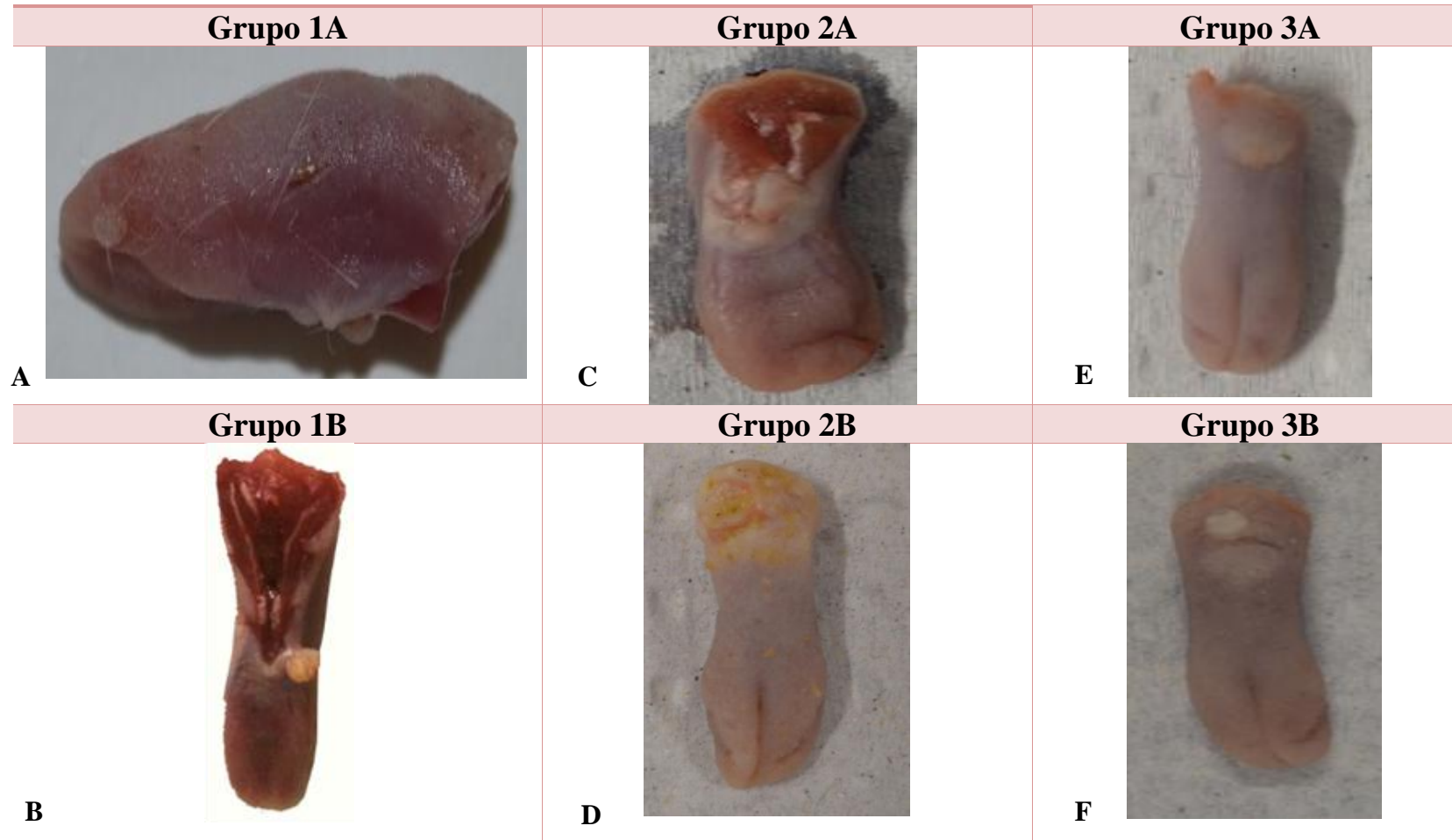


Figura 4: Administração de corticosteroide.

MACROSCOPIA

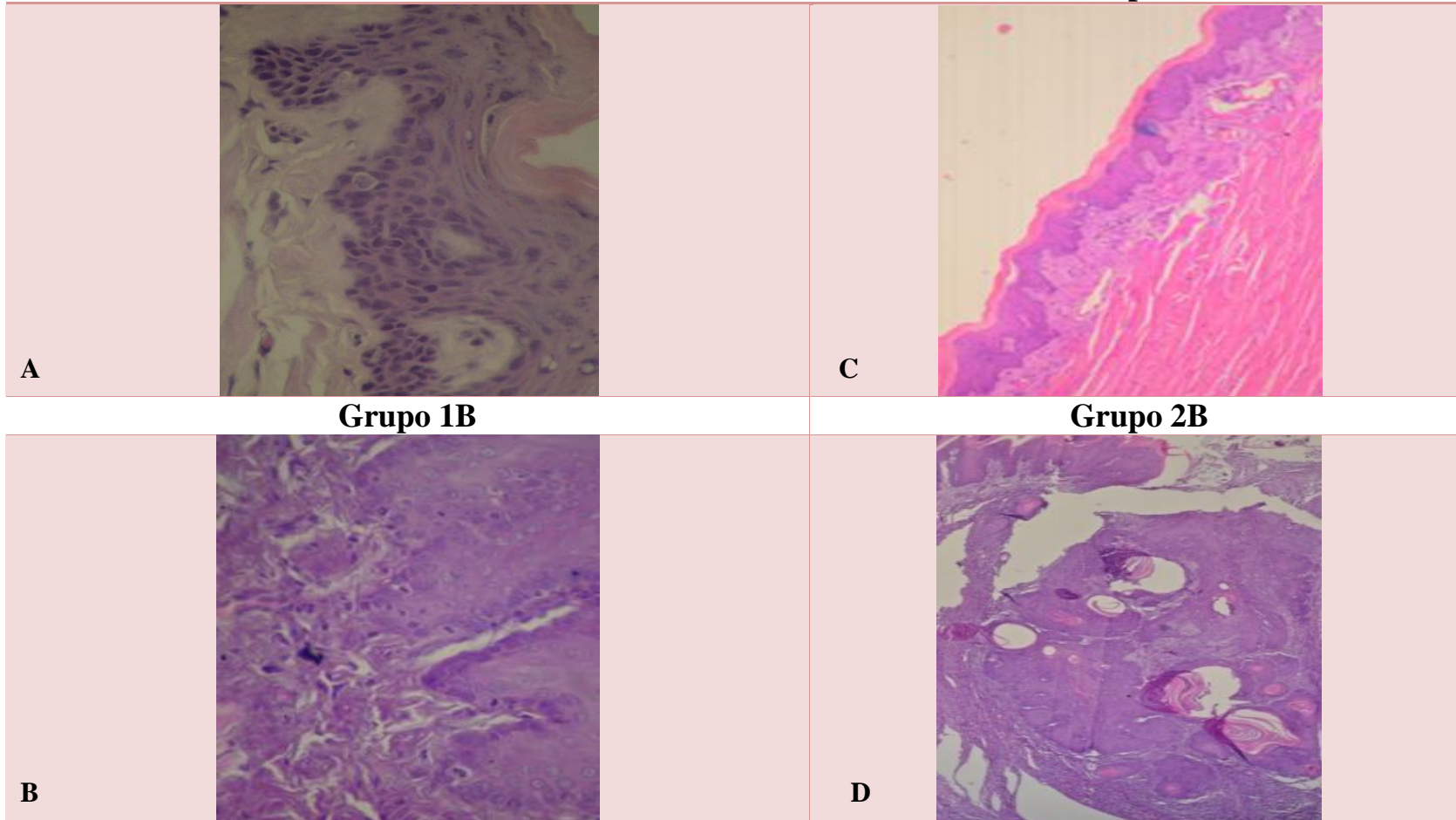


A) Lesão exofítica na borda lateral esquerda da língua de rata do grupo 1A; **B)** Lesão exofítica verrucosa no ventre lingual de rata do grupo 1B; **C)** Lesão esbranquiçada no ventre lingual de rata do grupo 2A. **D)** Lesão esbranquiçada com áreas eritematosas no dorso lingual de rata do grupo 2B; **E)** Lesão esbranquiçada no dorso lingual de rata do grupo 3A; **F)** Lesão esbranquiçada no dorso lingual de rata do grupo 3B .

MICROSCOPIA

Grupo 1A

Grupo 1B



A) DEO moderada em rata do grupo 1A em aumento de 100x; **B)** Invasão em rata do grupo 1B em aumento de 200x; **C)** DEO moderada em rata do grupo 2A em aumento de 100x; **D)** Invasão em rata do grupo 2B em aumento de 200x.

ISSN 1413-8123 *printed version*
ISSN 1678-4561 *online version*

- [Instructions for contributors](#)
- [Guidelines for the organization of thematic issues](#)
- [Recommendations for the submission of articles](#)
- [Presentation of manuscripts](#)

Instructions for contributors

Ciência & Saúde Coletiva publishes debates, analyses and research findings on specific themes considered to be of relevance to public health, as well as articles for discussion and analysis of the state of the art topics in the area and subareas, even if they are not directly related to the core theme under scrutiny. The journal is published monthly and sets out to tackle the challenges while seeking to consolidate and promote an ongoing update of trends of thought and practices in public health in a dialogue with the contemporary agenda of Science & Technology.

Guidelines for the organization of thematic issues

Within the diversity of magazines in the area, the hallmark of *Ciência & Saúde Coletiva* Journal is its thematic focus in line with ABRASCO's vocation to conduct in-depth study, as well as promote and disseminate academic debate and peer discussions on issues considered important and relevant and highlight the historical development of public health in Brazil.

The thematic editions are scheduled around four modes of submission:

- By Term of Reference sent by teachers/researchers in the area of public health (spontaneously or suggested by the Editors-in-Chief) when they consider it relevant to examine a given subject in greater depth.
- By Term of Reference sent by coordinators of unpublished and comprehensive research relevant to the area, on results presented in the form of articles within the guidelines described above. In these first two approaches, the Terms of Reference are evaluated on their scientific merit and relevance by the Associate Editors of the Journal.
- By Public Call for papers announced in a page in the journal, and coordinated by Guest Editors. In this case, the Guest Editors accumulate the task of selecting the articles according to their scope to be judged on their merit by referees.
- By Internal Organization of in-house Editors-in-chief, bringing together unsolicited articles under a relevant title within the criteria already described.

The Term of Reference shall contain: (1) title (even provisional) of the proposed thematic edition; (2) the name (or names) of the Guest Editor(s); (3) justification summarized in one or two paragraphs on the proposal from the point of view of the objectives, context, meaning and relevance for Public Health; (4) a list of the ten proposed articles already with the names of the invited authors; (5) the proposal with the text consisting of an opinion or interview with someone who has authority in the discussion of the subject; and (6) proposal of one or two synopses of books that address the theme.

By editorial decision, the maximum number of articles written by the same author in a thematic edition shall not exceed three, either as first author or co-author.

It is emphatically suggested to the organizers that they submit contributions by authors from various national institutions and from foreign contributors. As for any other form of presentation, these editions accept texts in Spanish, English and French.

Recommendations for the submission of articles

It is recommended that articles submitted shall not only address issues of local interest, or be restricted to the descriptive plane. The discussions shall submit a broadened analysis that situates the specificity of the research or review findings in the scenario of the national and international literature on the subject, making clear the original nature of the contribution that the article affords.

C&SC journal adopts the "Rules for submission of proposed articles for publication in medical journals," of the International Committee of Editors of Medical Journals, the Portuguese version of which is published in *Rev Port Clin Geral* 1997; 14:159-174. The document is available on various sites on the World Wide Web, such as by way of example, www.icmje.org or www.apmcg.pt/document/71479/450062.pdf. Careful scrutiny of the text by the authors is recommended.

Sections of the publication

Editorial: this is the responsibility of the editors-in-chief or guest editors and it shall contain no more than 4,000 characters with spaces.

Thematic Articles: these shall contain empirical, experimental and conceptual results of research and reviews on the topic in question. The research texts shall not exceed 40,000 characters with spaces.

Free Themed Articles: these shall be of interest to public health by free submission of authors through the journal page. They shall have the same characteristics as the thematic articles, namely up to 40,000 characters with spaces, with the results of research and present analyses and assessments of theoretical, methodological and conceptual trends of the area.

Review Articles: these shall consist of texts exclusively based on secondary sources, subjected to methods of theoretically time-honored thematic or unsolicited analysis, being no longer than 45,000 characters with spaces.

Opinion: texts that express a qualified position of one or several authors or interviews conducted with specialists on the subject under discussion in the journal; they shall not exceed 20,000 characters with spaces.

Synopses: critical analysis of books related to the thematic field of public health, published in the previous two years, the text of which shall not exceed 10,000 characters including spaces. The authors of the synopsis shall include the full reference details of the book at the beginning of the text. References cited throughout the text shall abide by the same rules as the articles. At the time of submission of the synopsis the authors shall insert a high resolution reproduction of the book cover in jpeg format as an attachment in the system.

Letters: with testimonials and suggestions about what is published in previous issues of the journal (no more than 4,000 characters with spaces).

Note: The maximum limit of characters shall take into account the spaces and include text and bibliography. The abstract and illustrations (figures and tables) are considered separately.

Presentation of manuscripts

1. The originals may be written in Portuguese, Spanish, French and English. Texts in Portuguese and Spanish shall feature the title, abstract and key words in the original language and in English. Texts in French

and English shall have the title, abstract and key words in the original language and in Portuguese. Footnotes or notes at the end of the article shall not be accepted.

2. The texts shall be double-spaced, in Times New Roman with a font size of 12, with 2.5 cm margins, in MS Word format and sent by electronic mail only (<http://mc04.manuscriptcentral.com/csc-scielo>) in accordance with the guidelines of the site.

3. Published articles shall be the property of *C&SC* journal, the full or partial reproduction thereof being prohibited in any medium, whether printed or electronic, without the prior permission of the editors-in-chief of the Journal. The secondary publication shall indicate the source of the original publication.

4. The articles submitted to *C&SC* shall not be offered simultaneously to other magazines.

5. Ethical issues relating to research publications involving human beings are the sole responsibility of the authors and shall be in accordance with the principles contained in the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (1964, as revised in 1975, 1983, 1989, 1989, 1996 and 2000).

6. The articles shall be submitted with authorization to reproduce previously published material, use illustrations that may identify people and to transfer copyright and other documents.

7. The concepts and opinions expressed in the articles, as well as the accuracy and validity of the quotations shall be the exclusive responsibility of the authors.

8. The texts are generally (but not necessarily) divided into sections with the title headings Introduction, Methods, Results and Discussion, with the inclusion of subheadings within some sections sometimes being required. The titles and subtitles of the sections shall not be organized with progressive numbering, but with graphical features (upper case, decrease in margin, etc.).

9. The title shall have no more than 120 characters with spaces and an abstract with a maximum of 1400 characters including spaces (including key words), which shall specify the scope, objectives, methodology, theoretical approach and the results of the research or investigation. Immediately below the abstract the authors shall indicate no more than five (5) key words. We draw attention to the importance of clarity and objectivity in writing the abstract, which shall certainly elicit the reader's interest in the article, and the key words that will assist in the multiple indexing of the article. The key words in the original language and in English shall be included in DeCS/MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/> and <http://decs.bvs.br/>).

Authorship

1. The people designated as authors shall have participated in the drafting of the articles such that they can publicly assume responsibility for their content. Qualification as an author shall assume: a) the conception and design or analysis and interpretation of data; b) drafting the article or revising it critically; and c) approval of the version to be published. The individual contributions of each author shall be specified at the end of the text (e.g. LMF worked on the design and final text and CMG worked on the research and methodology).

2. The article shall have up to eight authors in the header. The others will be included in the end of the article.

Nomenclature

1. The rules for public health/community health nomenclature, as well as abbreviations and conventions adopted in the specialized disciplines, shall be rigidly adhered to. Abbreviations shall be avoided in the title and abstract.

2. The full designation to which an abbreviation refers shall precede its

first appearance in the text unless it is a standard unit of measurement.

Illustrations

1. The illustrative material of *C&SC* journal includes tables (demonstrative elements such as numbers, measures, percentages, etc.), charts (demonstrative elements with textual information), graphs (schematic demonstration of a fact and its variations), figures (schematic demonstration of information by means of maps, diagrams, flowcharts, as well as by means of drawings or photographs). It shall be borne in mind that the magazine is printed in one color only, namely black, and if the illustrative material is colored, it will be converted to grayscale.
2. The number of illustrative materials shall not exceed five per article, with exceptions relating to articles of systematization of specific areas of a thematic field. In this case the authors shall negotiate with the editors-in-chief.
3. All illustrative material shall be numbered consecutively in Arabic numerals, with their respective captions and sources, and each one shall be attributed a brief title. All illustrations shall be cited in the text.
4. The tables and charts shall be drafted in the same program used in preparing the article (MS Word).
5. Graphs shall be in the MS Excel program, and the numerical data shall be submitted in a separate MS Word program or in another worksheet as text, to facilitate the use of the copy and paste feature. The graphs generated in an image program (Photoshop or Corel Draw) shall be sent in an open file with a copy in pdf.
6. The figure files (e.g. maps) shall be saved in (or exported to) the Illustrator or Corel Draw format with a copy in pdf. These formats retain the vector information, i.e. maintain the drawn lines of the maps. If it is impossible to save in these formats, files can be sent in TIFF or BMP formats, namely image formats that do not retain the vector information, which affects the quality of the result. If the TIFF or BMP format is used, it shall be saved in the highest resolution (300 DPI or more) and larger size (longest side = 18cm). The same applies to the material that is in photograph form. If the graphs cannot be sent in a digital medium, the original material shall be sent in good condition for reproduction.

Messages of Thanks

1. When these are included, they shall be placed before the bibliographical references.
2. The authors shall be responsible for obtaining written permission of the persons named in the messages of thanks, since readers may infer that such persons agree with the data and conclusions reached.
3. The messages of thanks for technical support shall be in a separate paragraph from other types of contribution.

References

1. References shall be numbered consecutively in accordance with the order in which they appear in the text. In the event that the references are from more than two authors, only the first author's name shall be cited in the text followed by *et al.*
2. References shall be identified by superscript Arabic numerals, as per the examples below:
Example 1: "Another indicator analyzed was the maturity of the PSF"¹¹
...
Example 2: "As Maria Adelia de Souza⁴ warns, the city..."

References only cited in tables and figures shall be numbered from the last reference number cited in the text.

3. References shall be listed at the end of the article in numerical order following the general norms of the *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

4. The names of journals shall be abbreviated according to the style used in the Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/>).
5. The names of individuals, cities and countries shall be cited in the original language of publication.