

Sarah Pereira Martins

Inativação da síntese de óxido nítrico sintase induzível não interfere na carcinogênese esofagiana murina induzida por N-óxido de 4-nitroquinolina

Inactivation of the synthesis of inducible nitric oxide synthase does not interfere with murine esophageal carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline N-oxide

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2024

Sarah Pereira Martins

Inativação da síntese de óxido nítrico sintase induzível não interfere na carcinogênese esofagiana murina induzida por N-óxido de 4-nitroquinolina

Inactivation of the synthesis of inducible nitric oxide synthase does not interfere with murine esophageal carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline N-oxide

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Banca examinadora:

Prof. Dra. Suzane Cristina Pigossi

Prof. Dra. Giovanna Ribeiro Souto

Suplentes:

Prof. Dra. Carla Silva Siqueira

Prof. Dra. Cizelene do Carmo Faleiros Veloso
Guedes

Uberlândia, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP
38400-902

Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 452, PPGODONTO				
Data:	Novo de Julho de Dois Mil e Vinte e Quatro	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	15:40
Matrícula do Discente:	12222ODO012				
Nome do Discente:	Sarah Pereira Martins				
Título do Trabalho:	<i>Inativação da síntese de óxido nítrico sintase induzível não interfere na carcinogênese esofagiana murina induzida por N-óxido de 4-nitroquinolina</i>				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Patologia e Diagnóstico Bucal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patologia e Diagnóstico Bucal				

Reuniu-se n o Anfiteatro/Sala 23 Bloco 4L - Anexo A Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Giovanna Ribeiro Souto (PUC MINAS), participou da defesa de Dissertação por meio de vídeo conferência desde a cidade de Belo Horizonte/MG; Suzane Cistina Pigossi (UFU); Sérgio Vitorino Cardoso (UFU); orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Sérgio Vitorino Cardoso, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Vitorino Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Suzane Cristina Pigossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovanna Ribeiro Souto, Usuário Externo**, em 11/07/2024, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5515392** e o código CRC **AF564719**.

Referência: Processo nº 23117.043369/2024-81

SEI nº 5515392

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M386
2024

Martins, Sarah Pereira, 1999-
Inativação da síntese de óxido nítrico sintase
induzível não interfere na carcinogênese esofagiana
murina induzida por N-óxido de 4-nitroquinolina [recurso
eletrônico] / Sarah Pereira Martins. - 2024.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.448>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Odontologia. I. Cardoso, Sérgio Vitorino, 1976-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
RESUMO	5
Palavras-chave:	6
ABSTRACT	6
Keywords:	7
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	7
2. CAPÍTULO 1	10
REFERÊNCIAS	30
ANEXO I	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

4NQO – *N*-óxido de 4-nitroquinolina

PPG – propilenoglicol

CCE – carcinoma de células escamosas

NO – óxido nítrico

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERO – espécies reativas de oxigênio

NMBA – *N*-nitrosomethylbenzylamine

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

REBIR – Rede de Biotérios de Roedores

µg/mL – microgramas por mililitro

µm – micrômetros

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

WT – selvagem

KO – nocaute

RNL – razão neutrófilo-linfócito

RPL – razão plaquetária-linfócito

IIS – índice de imunidade-inflamação sistêmica

RBCC – *red blood cell count*, contagem de células vermelhas

MCV – *mean corpuscular volume*, volume corpuscular médio

MHC – *mean hemoglobin concentration*, concentração média de hemoglobina

PLR – *platelet-to-lymphocyte ratio*, razão plaqueta-linfócitos

SII – *systemic immune-inflammation index*, índice imunidade-inflamação sistêmico

NLR – *neutrophil-to-lymphocyte ratio*, razão neutrófilo-linfócito

RESUMO

O câncer de esôfago é uma doença agressiva e frequente em diversos países e tem o tabagismo como um de seus principais fatores de risco. O conhecimento dos mecanismos de sua formação é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento. Nesse sentido, o óxido nítrico (NO) é uma molécula relevante em inúmeras condições fisiológicas e patológicas. Há evidências de que o aumento de sua expressão seja uma alteração relevante na origem do câncer de esôfago. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na carcinogênese esofágica em um modelo experimental com camundongos com inativação do gene *Nos2*. Os animais foram desafiados com o carcinógeno *N*-óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) e PPG (diluente). Após 24 semanas, a ocorrência de displasia e de carcinoma no revestimento epitelial do esôfago foi verificada em cortes histológicos e comparada estatisticamente entre os grupos de animais selvagens ($n = 23$) e nocaute ($n = 26$). Finalmente, parâmetros hematológicos foram comparados com a exposição ao carcinógeno e à ocorrência de displasia e carcinomas. A presença de carcinomas foi identificada apenas nos animais desafiados com o 4NQO, demonstrando a efetividade do modelo experimental. Todavia, nos animais expostos ao carcinógeno, a ocorrência de carcinoma foi muito similar entre os grupos. Alterações na contagem de plaquetas mostraram diferenças significantes conforme a presença de displasia ou carcinoma. Em suma, tais resultados não corroboram maior relevância para a enzima iNOS na ocorrência de câncer de esôfago, embora possa haver influência em outros aspectos da carcinogênese e da progressão tumoral nesse órgão.

Palavras-chave: Carcinogênese; Óxido Nítrico; Neoplasias esofágicas.

ABSTRACT

Esophageal cancer is an aggressive and frequent disease in several countries and has smoking as one of its main risk factors. Knowledge of the mechanisms behind its formation is extremely important for the development of new prevention and treatment strategies. In this sense, nitric oxide is a relevant molecule in numerous physiological conditions. There is evidence that increased expression is a relevant change in the origin of esophageal cancer. The objective of this study was to investigate the influence of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) on esophageal carcinogenesis in an experimental model with mice with inactivation of the iNOS gene. The animals were challenged with 4NQO (carcinogen) and PPG (diluent), diluted in the water available for ingestion over 16 weeks, followed by eight weeks without exposure to the carcinogen. The occurrence of carcinomas in the epithelial lining of the esophagus was then verified in histological sections and statistically compared between the groups of wild-type (n = 23) and knockout (n = 26) animals. Finally, hematological condition was evaluated according to carcinogen exposure and occurrence of epithelial dysplasia and carcinoma. The presence of carcinomas was identified only in animals challenged with 4NQO, demonstrating the effectiveness of the experimental model. However, in animals exposed to the carcinogen, the occurrence of carcinoma was very similar between wild-type and knockout animals. Platelet count varied according to *Nos2* condition and histopathology. In short, these results do not corroborate the greater relevance of the iNOS enzyme

in the occurrence of esophageal cancer, although it may have an influence on other aspects of carcinogenesis and tumor progression in this organ.

Keywords: Carcinogenesis; Nitric oxide; Esophageal Neoplasm.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O câncer de esôfago é uma doença agressiva, responsável pela morte de mais de 500 mil pessoas anualmente em todo o mundo, o que corresponde à sexta causa mais comum de morte relacionada a câncer. Sua incidência varia em diferentes países, sendo mais comum na Ásia e é frequente também em países da Europa e da América Latina. Sua incidência tem sido reduzida em alguns países (como a China e Colômbia) enquanto outros (Holanda e Dinamarca) tem sofrido aumento da incidência (Arnold *et al.*, 2020). No Brasil, onde a incidência da doença mostra discreta redução, estimativas recentes indicaram mais de 10.000 novos casos diagnosticados anualmente (Instituto Nacional de Câncer, 2023).

A doença compreende dois tipos histopatológicos principais, carcinoma de células escamosas (CCE) e adenocarcinoma, sendo o primeiro responsável pela maioria dos casos na maioria dos países (Lander *et al.*, 2023). Fatores de risco são melhor conhecidos para o CCE, destacando-se envelhecimento, má alimentação, falta de exercícios, obesidade, consumo de bebidas alcólicas e, principalmente, o tabagismo (Liu *et al.*, 2020). Quando o uso de tabaco acompanha o consumo de álcool, o risco de CCE de esôfago aumenta sinergicamente (Scherübl, 2022).

A sobrevida em cinco anos dos pacientes com diagnóstico de CCE de esôfago é inferior a 20% (Aziz *et al.*, 2023; Mukherjee *et al.*, 2023). Dado o prognóstico ruim, aprofundar o conhecimento a respeito dos mecanismos que conduzem a progressão tumoral é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento.

A identificação de moléculas-chave no desenvolvimento do câncer é muito importante para elucidar os mecanismos centrais que poderiam ser alvos de prevenção e terapia antineoplásica. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que, quando produzido em magnitude e ritmo adequados, atua como molécula de sinalização em processos biológicos como vasodilatação, resposta inflamatória e neurotransmissão. A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), codificada pelo gene *NOS2* em humanos (*Nos2* em camundongos), é uma das principais responsáveis pela produção de NO. Por outro lado, a síntese excessiva e desregulada desse radical tem sido implicada como causa ou fator contributivo para condições fisiopatológicas, incluindo câncer (Choudhari *et al.*, 2013).

Em particular, o NO e as espécies reativas dele derivadas, ao interagir com o DNA, produzem mutações que geram instabilidade genômica, na forma de desaminação nitrosativa, formação de nitrosamina, alquilação do DNA ou quebras da fita de DNA, além da inativação de proteínas (Burney *et al.*, 1999; Kilinc *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2024). A determinação do efeito predominante é complexa e, muitas vezes, depende do efeito do NO tecidual, da concentração administrada e do microambiente tumoral (Mintz *et al.*, 2021).

O 4NQO é um carcinógeno químico solúvel em água conhecido há mais de quatro décadas, com um complexo mecanismo carcinogênico que produz todos os três estágios do câncer: iniciação, promoção e progressão. É ativado no sistema biológico pela enzima 4NQO redutase, muito presente em língua e esôfago de camundongos (Kondo *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 2022). O 4NQO favorece mutações aleatórias mediante reação irreversível com a parte nucleofílica do DNA, preferencialmente a resíduos de guanina, formando adutos que interferem com a síntese da molécula complementar do DNA (Tada *et al.*, 1976; Li *et al.*, 2020; Sagheer *et al.*, 2021). Além das interações diretas com o genoma, o 4NQO é um indutor de estresse oxidativo intracelular que gera EROs também capazes de ligação mutagênica ao DNA, bem como danos a proteínas e lipídios que contribuem para progressão tumoral (Sagheer *et al.*, 2021). O 4NQO também tem sido utilizado em modelos murinos para identificar características genômicas precoces no processo de carcinogênese esofágica, dentre outros aspectos (Tada *et al.*, 1976; Kondo *et al.*, 1977; Zheng *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Sagheer *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

O microambiente tumoral tem papel central no crescimento dos cânceres. A inflamação está associada à tumorigênese, progressão do câncer e aumento do risco de metástases à distância. Além disso, as células de resposta envolvidas, como linfócitos, neutrófilos e plaquetas, desempenham funções cruciais dentro do microambiente tumoral. Assim, vários biomarcadores inflamatórios derivados de células do sangue periférico, como a razão plaquetas/linfócitos (PLR) e a relação neutrófilo/linfócito (NLR), têm demonstrado ter valor prognóstico significativo em casos de câncer de cabeça e pescoço (Wang *et al.*, 2022). Já os eosinófilos, conhecidamente envolvidos em doenças alérgicas ou infecção por

helmintos, demonstraram em pesquisas iniciais redução da tumorigênese quando aumentados (Jacobse *et al.*, 2023).

2. CAPÍTULO 1

Periódico: Experimental and Molecular Pathology.

Título: Inativação da síntese de óxido nítrico sintase induzível não interfere na carcinogênese esofagiana murina induzida por *N*-óxido de 4-nitroquinolina

Sarah Pereira Martins, Anaíra Ribeiro Guedes Fonseca Costa, Débora de Oliveira Santos, Tássio Edno Atanásio Pitorro, Pedro Victor Silva Duarte, Adriano Mota Loyola, Sérgio Vitorino Cardoso

Área de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Autor de Correspondência

Sérgio Vitorino Cardoso, Área de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Bloco 2G, sala 9, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 38.405-302.

Telefone: +55-34-3225-8118

E-mail: sv.cardoso@ufu.br

Introdução

O câncer de esôfago é uma doença agressiva, responsável pela morte de mais de 500 mil pessoas anualmente em todo o mundo, o que corresponde à sexta causa mais comum de morte relacionada a câncer (6,7). A doença compreende dois tipos histopatológicos principais, carcinoma de células escamosas (CCE) e adenocarcinoma, sendo o primeiro responsável pela maioria dos casos na maioria dos países (3).

Destacam-se como fatores de risco para o CCE o envelhecimento, má alimentação, falta de exercícios, obesidade, consumo de bebidas alcólicas e, principalmente, o tabagismo (4). A sobrevida em 5 anos dos pacientes com diagnóstico de CCE de esôfago é inferior a 20% (6,7). Dado o prognóstico ruim, aprofundar o conhecimento a respeito dos mecanismos que conduzem a progressão tumoral é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento.

O microambiente tumoral tem papel central no crescimento dos cânceres. Células envolvidas na inflamação sistêmica, como linfócitos, neutrófilos e plaquetas, desempenham funções cruciais dentro do microambiente tumoral. Assim, vários biomarcadores inflamatórios derivados de células do sangue periférico, como a razão plaquetas/linfócitos (PLR) e a relação neutrófilo/linfócito (NLR), têm demonstrado ter valor prognóstico significativo em casos de câncer de cabeça e pescoço (20). Já os eosinófilos, conhecidamente envolvidos em doenças alérgicas ou infecção por helmintos, demonstraram em pesquisas iniciais redução da tumorigênese quando aumentados (21).

A identificação de moléculas-chave no desenvolvimento do câncer é muito importante para elucidar os mecanismos centrais que poderiam ser alvos de prevenção e terapia antineoplásica. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que, quando produzido em magnitude e ritmo adequados, atua como molécula de sinalização em processos biológicos como vasodilatação, resposta inflamatória e neurotransmissão. Por outro lado, a síntese excessiva e desregulada de NO tem sido implicada como causa ou contribuindo para condições fisiopatológicas, incluindo câncer (8). A determinação do efeito predominante é complexa e, muitas vezes, depende do efeito do NO tecidual, da concentração administrada e do microambiente tumoral (13).

O 4NQO é um carcinógeno químico solúvel em água conhecido há mais de quatro décadas, com um complexo mecanismo carcinogênico que produz todos os três estágios do câncer: iniciação, promoção e progressão. É ativado no sistema biológico pela enzima 4NQO redutase, muito presente em língua e esôfago de camundongos (14,15). O composto tem sido utilizado em modelos murinos para identificar características genômicas precoces no processo de carcinogênese esofágica, dentre outros aspectos (15,19).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da enzima iNOS na carcinogênese esofágica, analisando a incidência de carcinomas em camundongos com inativação do gene *Nos2* e tratados com o carcinógeno 4NQO.

Materiais e métodos

Este estudo foi desenvolvido a partir de experimento concebido para avaliar como desfecho primário a formação de tumores em língua, cujos resultados já foram relatados (Santos et al., 2024; Costa, 2022).

Os procedimentos experimentais aqui relatados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU, registro nº 100/18).

Animais

A unidade experimental consistiu em camundongos (*Mus musculus*) machos de duas linhagens diferentes: C57BL/6J (sem modificação no gene *Nos2*, denominados “selvagens”) e B6.129P2-*Nos2*^{tm1Lau/J} (com inativação do gene *Nos2*, denominados “nocaute”). Os camundongos selvagens foram cedidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais com o gene *Nos2* inativo (estoque JAX #002609) foram cedidos pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). A linhagem geneticamente modificada nocaute foi desenvolvida no Centro de Ciências da Saúde da Universidade da Virgínia e é fornecida internacionalmente pelo Laboratório Jackson (Bar Harbor, EUA). Resumidamente, Laubach *et al.*, 1995 (22) usaram um vetor de direcionamento com resistência à neomicina e genes de timidina quinase do vírus herpes simplex para romper os éxons 12 e 13 do domínio de ligação à calmodulina do gene *Nos2*. Os animais obtidos com este método foram cruzados com C57BL/6 e retrocruzados com C57BL/6J por 11 gerações e não apresentam resposta sérica

de NO. O universo amostral consistiu em 61 animais, de acordo com Tang *et al.*, (23), distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, estabelecidos de acordo com a exposição ao carcinógeno 4NQO e com a condição do gene *Nos2*: controle/selvagem ($n = 15$), controle/nocautado ($n = 15$), experimental/selvagem ($n = 15$) e experimental nocautado ($n = 16$).

Os animais avaliados eram livres de patógenos específicos, tinham entre 8 e 12 semanas de idade e pesavam $24,2 \pm 2,6$ g no início do tratamento. Todos os procedimentos experimentais foram realizados na REBIR-UFU, com os animais mantidos em microisoladores ventilados de 32 x 20 x 21cm, a 22°C, ciclos claro-escuro de 12h, livre acesso a ração comercial para roedores e água esterilizada.

Protocolo experimental

Os camundongos dos grupos experimentais foram expostos ao 4NQO (N8141, Sigma-Aldrich, San Louis, EUA) diluído em PPGe em seguida na água disponível para os animais, na concentração de 50µg/mL de 4NQO na água, conforme proposto por Tang *et al.* (2004) (23). Os grupos controles receberam apenas PPG diluído em água. As soluções foram apresentadas como a única fonte de água disponível aos animais durante 16 semanas (“período de exposição”). Em seguida, tais substâncias foram retiradas e apenas água foi oferecida por 8 semanas (“período de observação”). Ao final, os camundongos foram anestesiados com administração intraperitoneal de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), seguida por punção do plexo vascular retro-orbital para coleta de aproximadamente 1mL de sangue periférico, depositado em tubos de

EDTA, e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical conforme proposto por Parasuraman *et al.* 2010 (24).

O esôfago foi extraído mediante acesso por corte longitudinal mediano da pele, identificado como uma delgada estrutura tubular e retilínea, localizada predominantemente na cavidade torácica, delimitada pela faringe e pelo estômago. Após avaliação macroscópica, foram fixados em paraformaldeído a 7%, por 24 horas, e então embebidos em parafina. Cortes histológicos de 3µm foram corados com hematoxilina e eosina e digitalizados (Aperio AT2, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) com ampliação de 400x.

As alterações no revestimento epitelial do esôfago foram analisadas por dois patologistas. Achados de interesse consistiram na presença de displasia, formações tumorais exofíticas e carcinomas, esses caracterizados por pleomorfismo celular, alterações arquiteturais e invasão do tecido conjuntivo, não importando se superficial ou profunda. Ainda, foram avaliadas a presença de infiltrado inflamatório subjacente ao epitélio, com especial interesse em eosinófilos.

Análise do microambiente tumoral

O microambiente tumoral foi analisado com o *software* Image Pro PLUS, versão 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA), a partir das lâminas digitalizadas. Três áreas de estroma adjacente ao carcinoma foram selecionadas no aumento de 20X, nas quais foram marcados e classificados 250 pontos para avaliação dos seguintes parâmetros: estroma tumoral, células inflamatórias, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibras colágenas e artefato. Para cada

camundongo, o resultado foi estabelecido pela média da área ocupada por cada parâmetro nas três áreas avaliadas (25).

Análise estatística

As análises inferenciais foram realizadas nas calculadoras disponíveis no portal Social Science Statistics (<https://www.socscistatistics.com>). Análises de contingência com teste exato de Fisher foram realizadas para verificar diferenças na incidência de lesões entre os grupos. Teste *t*, de Kruskal-Wallis ou ANOVA foram empregados para avaliar diferenças quantitativas relacionadas a parâmetros hematológicos na comparação de grupos e alterações histopatológicas. O nível de significância foi estabelecido em 5%

Resultados

Ao longo do experimento, 11 camundongos evoluíram a óbito, dos quais dois (do grupo nocaute) ainda no período de aclimatação ao local do experimento, outro por apresentar deformidade dentofacial que resultou em desnutrição inanição e os demais por caquexia neoplásica¹. Ainda, três amostras de esôfago foram perdidas durante sua retirada e processamento histológico. Ao final, foram avaliados 47 animais, sendo 23 selvagens e 24 nocaute.

Durante a macroscopia, os esôfagos foram observados como fragmentos longilíneos de tecido mole, delgados, pardacentos, medindo cerca de 2 cm em

¹ Tais animais desenvolveram tumores orais e esofageanos exofíticos que obstruíram vias alimentares e respiratórias, ocasionando o óbito.

sua maior extensão, por vezes com lesões exofíticas visíveis conforme ilustrado na Figura 1.

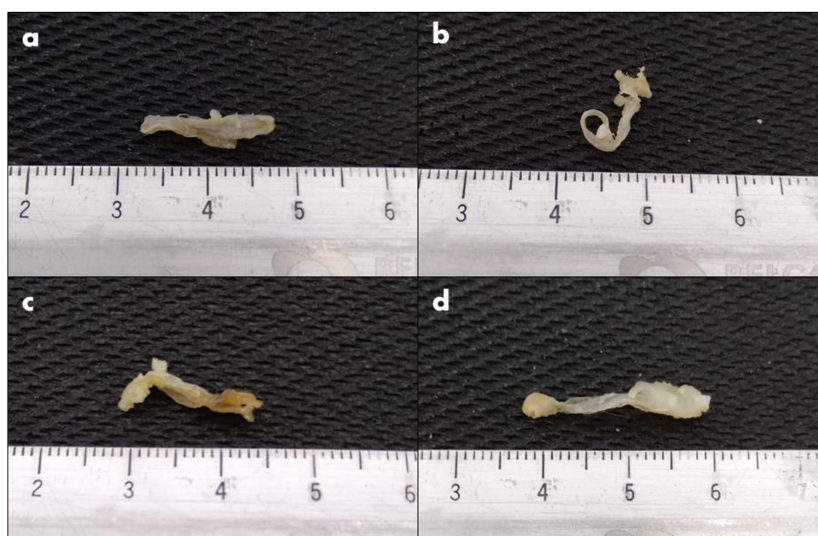


Figura 1. Amostras de esôfago de camundongos expostos a N-óxido de 4-nitroquinolina, fotografadas em exame macroscópico após retirada por necrópsia e posterior fixação em formalina. Verifica-se em algumas delas projeções exofíticas reconhecidas como tumores.

Como apresentado na Figura 2, independentemente da condição gênica nenhum dos 21 camundongos que receberam apenas PPG desenvolveu carcinoma, nem mesmo tumores exofíticos ou displasia do epitélio de revestimento. Já em relação aos 26 animais desafiados com 4NQO, 65% apresentaram carcinoma. Tais resultados mostram uma forte e estatisticamente significativa associação entre a exposição ao carcinógeno e o desenvolvimento de carcinomas ($p = 0,00002$; teste exato de Fisher).

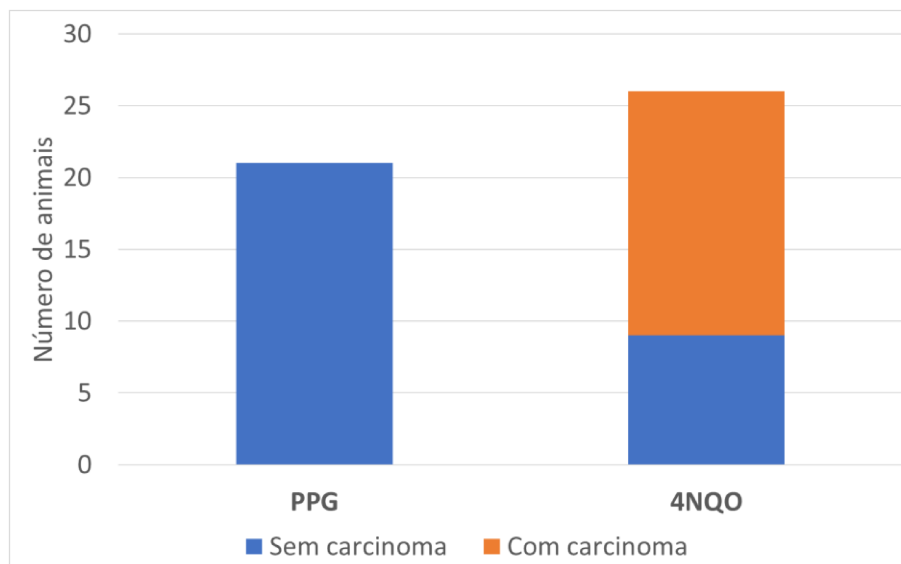


Figura 2. Proporção de camundongos que desenvolveram carcinoma em desafio com carcinógeno N-óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) ou apenas ingestão do veículo propilenoglicol (PPG).

Ainda quando desconsiderada a condição do gene *Nos2*, a exposição ao 4NQO também resultou em alterações hematológicas, com aumento significativo do número de neutrófilos, RNL, plaquetas, RPL e IIS, embora com redução de linfócitos, conforme mostrado na Figura 3. Contudo, tais diferenças não se apresentaram entre animais selvagem e nocaute, exceto na análise de plaquetas.

Como destacado na Figura 3D, a contagem de plaquetas no sangue periférico aumentou significativamente com a progressão da carcinogênese oral em camundongos KO. Os valores médios foram maiores em animais KO com carcinomas (2877 ± 541) quando comparados aos animais com displasia epitelial (2656 ± 360) e mucosa normal (2016 ± 296). Além disso, os animais KO com carcinoma tiveram maior contagem periférica de plaquetas quando comparados animais WT com carcinoma (1731 ± 477).

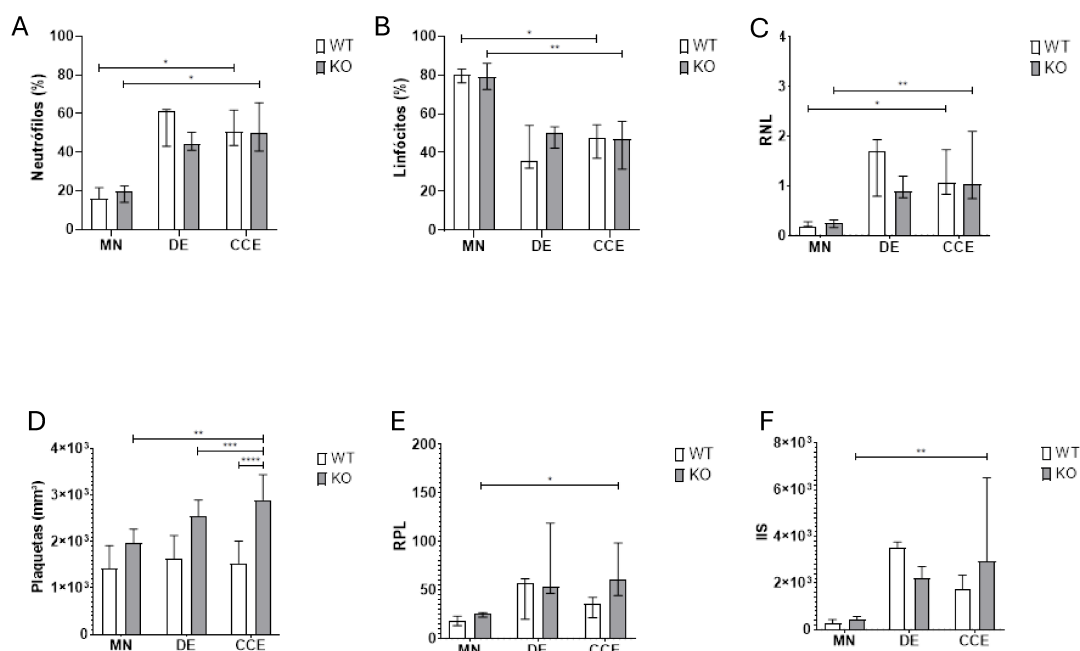


Figura 3. Marcadores inflamatórios sistêmicos entre camundongos selvagens (WT) e nocaute (KO) para o gene *Nos2*, considerando aqueles não expostos a N-óxido de 4-nitroquinolina, com mucosa normal (MN), e os animais expostos a esse carcinógeno que desenvolveram apenas displasia epitelial (DE) ou apresentaram carcinoma de células escamosas (CCE). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) apontadas nas barras horizontais com asteriscos (A a C, E e F – teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; D – teste ANOVA com pós-teste de Tukey).

Aspectos histopatológicos representativos dos principais achados do modelo são apresentados na Figura 4. O epitélio de revestimento do esôfago de todos os camundongos expostos apenas ao PPG apresentaram-se com aspecto de normalidade, ao contrário daqueles expostos ao 4NQO. Nesse último grupo, todos mostraram focos de displasia epitelial e 17 (36%) desenvolveram carcinomas.

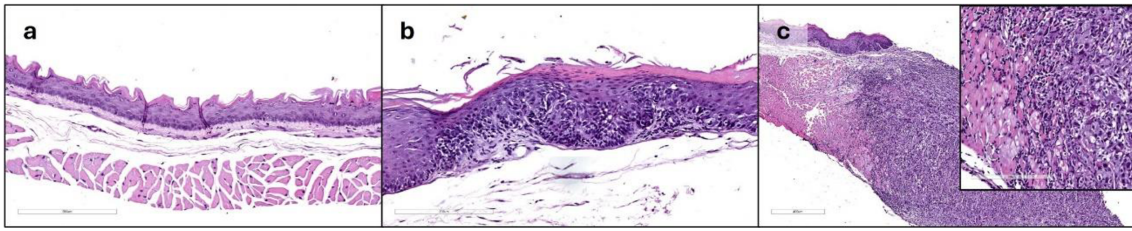


Figura 4. Fotomicrografias ilustrando epitélio de revestimento do esôfago de camundongo tratados com propilenoglicol apresentando aspecto de normalidade (a), mucosa de animais desafiados com N-óxido de 4-nitroquinolina apresentando displasia (b) e carcinoma (c). Todas as imagens foram obtidas de animais nocaute para o gene *Nos2*. Coloração: hematoxilina e eosina.

Considerados apenas os camundongos expostos ao 4NQO, verificou-se que o desenvolvimento de carcinomas ocorreu em proporção muito semelhante entre animais selvagens e nocaute para o gene *Nos2* (64% versus 67%, respectivamente; $p = 1,0$, teste exato de Fisher), como apresentado na Figura 5.

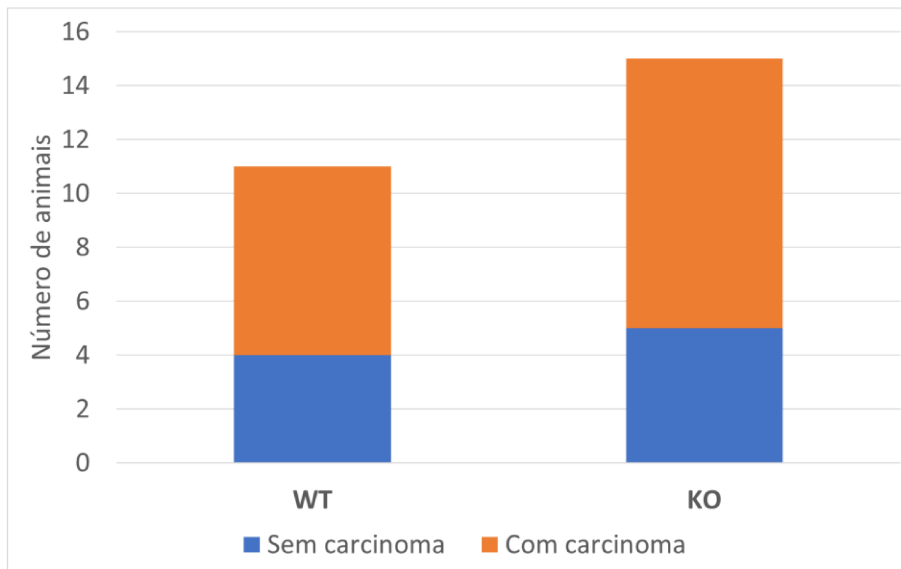


Figura 5. Proporção de camundongos selvagens (WT) ou nocaute (KO) para o gene *Nos2*, desafiados com carcinógeno 4NQO, segundo proporção de indivíduos com carcinomas.

Novamente de forma restrita aos camundongos expostos ao 4NQO, verificou-se proporção mais frequente de tumores exofíticos nos animais nocaute do que nos selvagens (60% e 36%, respectivamente), como ilustrado na Figura 6. Todavia, não foi verificada associação estatística significativa entre esses parâmetros ($p = 0,43$; teste exato de Fisher).

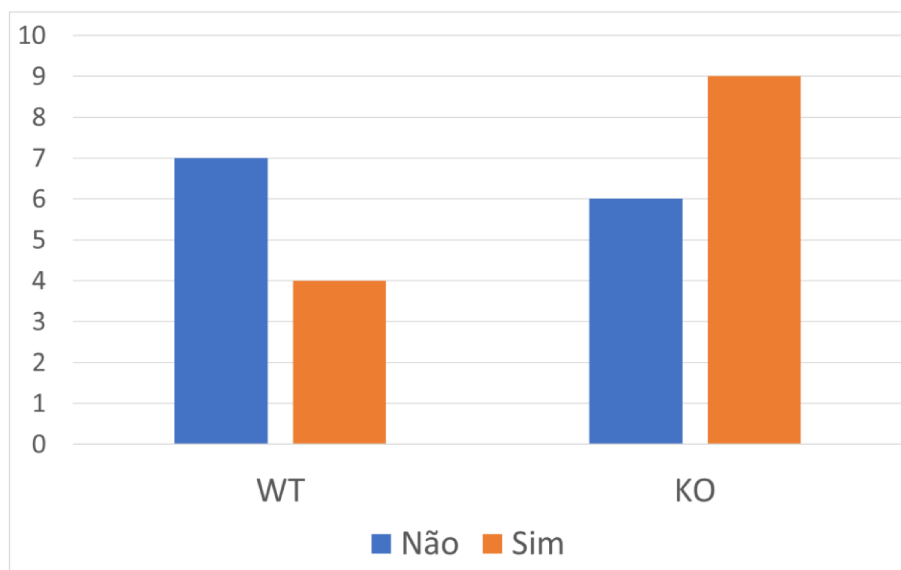


Figura 6. Proporção de camundongos selvagens (WT) ou nocaute (KO) para o gene *Nos2*, segundo a presença de lesões exofíticas.

Ainda dentre os camundongos expostos ao 4NQO, os animais selvagens mostraram proporcionalmente mais carcinomas pobremente diferenciados do que os animais nocaute (Figura 7). Todavia, essa diferença não foi suficiente para identificar associação estatisticamente significativa entre condição gênica e diferenciação histológica dos tumores ($p = 0,62$; teste exato de Fisher).

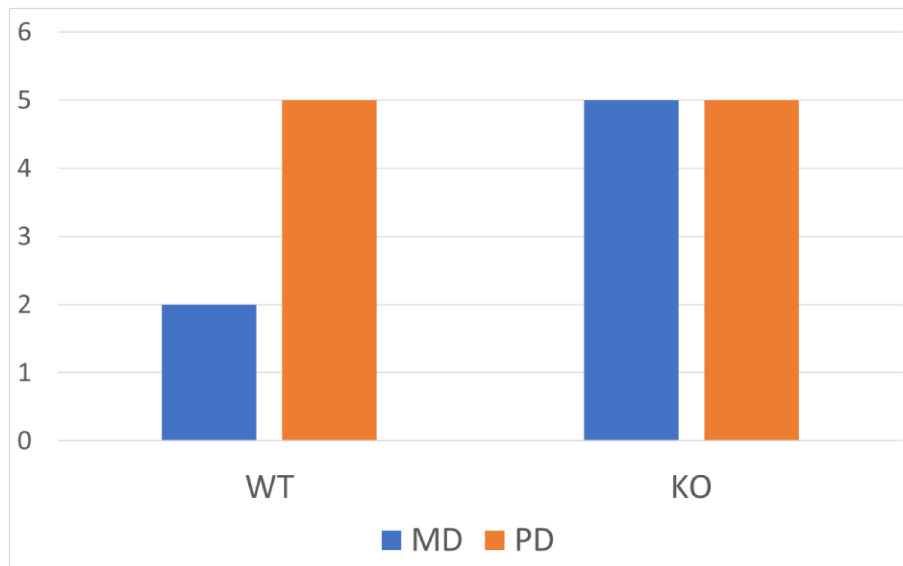


Figura 7. Proporção de camundongos selvagens (WT) ou nocaute (KO) para o gene *Nos2*, segundo a classificação histopatológica dos carcinomas em moderadamente diferenciados (MD) e pouco diferenciados (PD).

Infiltrado inflamatório foi observado subjacente a todos os carcinomas, independentemente da condição gênica. A presença de eosinófilos também não se mostrou estatisticamente associada à condição gênica, como mostrado na Figura 8 ($p = 1,0$; teste exato de Fisher).

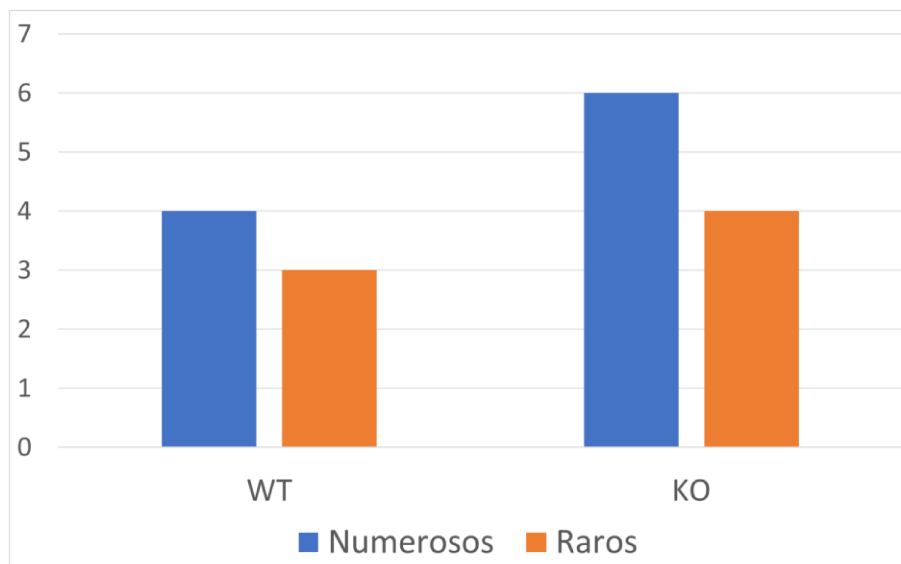


Figura 8. Proporção de camundongos selvagens (WT) ou nocaute (KO) para o gene *Nos2*, segundo a presença de eosinófilos.

Variáveis relacionadas ao microambiente tumoral não mostraram variação significativa em função da condição gênica, dados na Tabela 1 (teste *t*).

Tabela 1. Variáveis do microambiente tumoral, dentre animais selvagens ou nocaute para o gene *Nos2*.

	Média (desvio-padrão)				
	Inflamação	Vasos	Colágeno	Células tumorais	Estroma
WT	7,7 (4,2)	5,4 (2,3)	18,7 (5,4)	50,4 (8,4)	15,2 (7,0)
KO	8,1 (5,4)	5,4 (2,4)	13,4 (6,0)	54,6 (11,6)	16,2 (8,8)
<i>p</i> (teste <i>t</i>)	0,88	0,94	0,08	0,43	0,8

Finalmente, nos animais expostos ao 4NQO, parâmetros hematológicos também não mostraram associação com a condição gênica, como pode ser observado na Tabela 2 (teste *t*).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos, dentre animais selvagens ou nocaute para o gene *Nos2*.

	Média (desvio-padrão)				
	RBCC	MCV	MHC	MCHC	Platelet
WT	12,5 (6,0)	43,3 (1,1)	14,1 (14,1)	33,0 (2,0)	3974,9 (7588,7)
KO	9,9 (1,9)	43,1 (2,5)	14,0 (0,6)	32,6 (0,9)	2770,6 (501,6)
Teste <i>t</i>	0,13	0,87	0,58	0,52	0,56

	Média (desvio-padrão)				
	PLR	SII	Neutrophil	Lymphocyte	NLR
WT	134,8 (291,9)	8923,9 (20627,8)	52,4 (12,6)	44,7 (12,1)	1,3 (0,6)
KO	73,7 (42,8)	4426,6 (3999,2)	51,1 (16,3)	43,6 (13,4)	1,5 (1,2)
<i>p</i> (Teste <i>t</i>)	0,46	0,45	0,83	0,84	0,66

Discussão

Com base em evidências atuais sobre a relação entre o NO e desenvolvimento e progressão do câncer, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da enzima iNOS na carcinogênese esofágica, a partir da verificação da ocorrência de lesões em camundongos do tipo selvagem e nocaute para o gene *Nos2* tratados com o carcinógeno químico 4NQO.

Estudos *in vitro* com células em cultura são úteis para o estudo da carcinogênese, com vantagens tais como relativa simplicidade, conveniência, bom custo-efetividade e automação, porém não é adequado extrapolar totalmente os achados em células cancerosas humanas para aplicações preventivas, diagnósticas e terapêuticas já que a cultura não pode representar a complexidade do microambiente tumoral, tampouco as diversas condições clínicas e sociais dos pacientes (17). Estudos *in vivo* com CCE induzido por agentes carcinógenos em animais experimentais correspondem melhor às

alterações na arquitetura epitelial, ativação do estroma e recrutamento de células imunes e vasos sanguíneos, dentre outros aspectos, vistas nos tumores humanos. Assim, modelos animais podem ser úteis para compreender os determinantes da origem e progressão do CCE de esôfago.

Chen *et al.* observaram que em ratos tratados com NMBA há aumento no mRNA para iNOS em tecidos pré-neoplásicos e papilomas, comparados a tecido normal (26), e que há redução na incidência de tumores esofágicos (tendo identificado apenas lesões descritas como cancerizáveis e papilomas) em ratos tratados com inibidor de iNOS (27). Nesse sentido, modelos com camundongos transgênicos podem trazer informações mais específicas sobre as vias moleculares da doença (18).

O 4NQO é um carcinógeno sintético e considerado o melhor produto químico para induzir alterações histológicas semelhantes em animais às dos seres humanos. Numerosos estudos relataram a indução de 4NQO de carcinoma oral e esofágico em modelos de ratos e camundongos (15). Ele imita os efeitos cancerígenos do uso crônico do tabaco, que é o principal fator de risco para o CCE de esôfago, ao causar estresse oxidativo intracelular, adução de DNA, mutagênese e indução tumoral (18). Para investigar a influência de diferentes moléculas neste processo, vários modelos de camundongos combinando modificações genéticas com tratamento 4NQO tem sido testados (28,29). Até onde a autora sabe, esta é a primeira investigação do efeito no esôfago do tratamento com 4NQO em camundongos nocaute para *Nos2*.

O NO é um radical livre gasoso permeável a membranas biológicas, que funciona como um mensageiro intercelular e intracelular, desempenhando papéis fundamentais em uma série de processos, incluindo metabolismo celular, morte

celular e sobrevivência celular. A relação entre câncer gastrointestinal e NO e EROs foi proposta pela primeira vez na década de 1970 (11). Outros estudos demonstraram que a expressão da iNOS estaria envolvida no processo de carcinogênese esofágica (26,30,31). De fato, foi verificado no presente estudo que houve número maior de carcinomas nos animais nocaute do que dos selvagens, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Tal resultado não corrobora papel relevante para o NO na ocorrência de CCE no esôfago, todavia não exclui a participação dessa molécula em outras etapas e parâmetros da carcinogênese e da progressão tumoral nesse órgão, as quais demandam investigações adicionais.

O microambiente do tumor é infiltrado por uma população heterogênea de células do sistema imunológico, cada uma desempenhando um papel diferente na comunicação entre as células cancerígenas e o hospedeiro, favorecendo ou suprimindo a progressão tumoral (32). Essa comunicação é impulsionada por uma rede complexa e dinâmica de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas histolíticas, proteínas pró-inflamatórias e remodeladoras da matriz extracelular as quais são capazes de modular diretamente o desenvolvimento tumoral (33).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e têm sido considerados como primeira linha de defesa no braço inato do sistema imunológico. O microambiente em diferentes tecidos pode induzir os neutrófilos a adquirir funções especializadas. No caso de câncer, o número de neutrófilos na circulação aumenta, e o fenótipo dessas células muda ao longo da progressão do tumor. (34). Ao contrário dos neutrófilos, os linfócitos fornecem proteção do hospedeiro contra tumores. Assim, a infiltração de linfócitos está associada a um

melhor prognóstico. Em contrapartida, a linfopenia indica comprometimento da imunidade celular contra tumores e está associada a um mau prognóstico (35). No presente estudo foi observado aumento do número de neutrófilos e diminuição da contagem de linfócitos nos animais com carcinoma de ambas as linhagens, em comparação aos animais sem alteração. A interação entre o dano causado pela neutrofilia e o efeito protetor dos linfócitos pode ser medida pela NLR, que também foi maior nos casos de carcinomas.

Enquanto os eosinófilos são conhecidos efetores em doença alérgica, novas funções têm sido descobertas na patobiologia do câncer. Jacobse *et al*, 2023 demonstraram que os eosinófilos infiltram o CCE humano em maior extensão nos estágios iniciais versus tardios. Além disso, foi visto aumento de eosinófilos concomitante a aumento de iNOS em esôfago em outro modelo de carcinogênese em camundongos transgênicos (36) e que a redução do número de eosinófilos por diferentes estratégias exacerba a tumorigênese (34). Em nosso estudo, os eosinófilos e o infiltrado inflamatório foram observados tanto em áreas de displasia e de carcinoma, sem diferença entre animais selvagem e nocaute para *Nos2*.

As plaquetas atuam como células multifuncionais participando da resposta imune, inflamação, alergia, regeneração tecidual e linfoangiogênese. Entre os aspectos mais bem estabelecidos do papel das plaquetas em distúrbios não hemostáticos ou trombóticos, destaca-se sua participação na invasão do câncer e na metástase. A interação de muitas células cancerosas diferentes com plaquetas leva à ativação plaquetária e, por outro lado, a ativação plaquetária é fortemente instrumental para as atividades pró-carcinogênicas e pró-metastáticas das plaquetas (37). Animais nocaute com carcinoma apresentaram

maior nível na contagem de plaquetas, do que animais selvagens com carcinoma. A hipótese para o ocorrido é que haveria um aumento na agregação plaquetária devido à falta de NO, porém, são necessários mais assuntos sobre o tema.

Por fim, o IIS foi maior apenas para animais KO com carcinoma em comparação com a mucosa normal. Este índice é calculado como contagem de plaquetas \times contagem de neutrófilos/contagem de linfócitos, e é um biomarcador recentemente proposto que tem sido usado para o prognóstico de várias neoplasias. Trabalhos relataram que um aumento da IIS prediz piores resultados de sobrevida em vários tipos de câncer (20).

Este estudo limita-se a um único período de observação de 8 semanas após o tratamento com 4NQO. Períodos maiores podem trazer novas informações, considerando que outros estudos acompanharam os animais por até 16 semanas (23,28). De acordo com a literatura, a neoplasia escamosa do esôfago induzida por 4-NQO progride de hiperplasia para displasia, e de displasia para carcinoma ao longo do tempo (6). Tendo em vista a grande quantidade de áreas identificadas com displasia, seria esperado um número maior de lesões ao final de 32 semanas de experimentação em comparação com 24 semanas.

Outro aspecto é a falta de padronização na literatura dos parâmetros morfológicos para classificação das lesões de esôfago murino (18), o que gera algum nível de subjetividade nas análises. Por fim, devido à forma de preparação da amostra, nem toda a extensão do esôfago é examinada em cada corte e lesões podem ser perdidas neste processo, sendo oportuno o desenvolvimento de dispositivos ou técnicas para melhor avaliação da extensão do órgão.

Com base nestes resultados, concluímos que a ausência de iNOS não tem efeito aparente na incidência de carcinomas induzidas por 4NQO em camundongos, destacando que o estudo aqui apresentado tem limitações que impedem a extrapolação de seus resultados a etapas específicas da carcinogênese e da progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. **Gastroenterology**. 2020;159(1):335-349.e15.
2. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: **Instituto Nacional De Câncer**; 2023. 160 p.
3. Lander S, Lander E, Gibson MK. Esophageal Cancer: Overview, Risk Factors, and Reasons for the Rise. **Curr Gastroenterol Rep**. 2023;25(11):275–9.
4. Liu CQ, Ma YL, Qin Q, Wang PH, Luo Y, Xu PF, et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040. **Thorac Cancer**. 2023;14(1):3–11.
5. Scherübl H. Tobacco Smoking and Gastrointestinal Cancer Risk. **Visc Med**. 2022;38(3):217–22.
6. Aziz Z, Washington MK, Jacobse J, Choksi Y. A method for scoring 4-nitroquinoline 1-oxide-induced murine esophageal squamous neoplasia. **Vet Pathol**. 2023;60(3):384–93.
7. Mukherjee A, Epperly MW, Fisher R, Shields D, Hou W, Pennathur A, et al. Carcinogen 4-Nitroquinoline Oxide (4-NQO) Induces Oncostatin-M (OSM) in Esophageal Cells. **In Vivo**. 2023;37(2):506–18.
8. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. **World J Surg Oncol**. 30 de maio de 2013;11:118.
9. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutat Res**. 1999;424(1–2):37–49.
10. Kilinc K, Kilinc A. Mutagenic Actions of Nitrogen Oxides. **Indoor and Built Environment**. 2005;14(6):503–12.
11. de Oliveira GA, Cheng RYS, Ridnour LA, Basudhar D, Somasundaram V, McVicar DW, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase in the Carcinogenesis of Gastrointestinal Cancers. **Antioxid Redox Signal**. 2017;26(18):1059–77.
12. Chen T. Unveiling the significance of inducible nitric oxide synthase: Its impact on cancer progression and clinical implications. **Cancer Lett**. 2024;592:216931.
13. Mintz J, Vedenko A, Rosete O, Shah K, Goldstein G, Hare JM, et al. Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. **Vaccines (Basel)**. 2021;9(2):94.
14. Kondo S. A test for mutation theory of cancer: carcinogenesis by misrepair of DNA damaged by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Br J Cancer**. 1977;35(5):595–601.
15. Liu Z, Su R, Ahsan A, Liu C, Liao X, Tian D, et al. Esophageal Squamous Cancer from 4NQO-Induced Mice Model: CNV Alterations. **Int J Mol Sci**. 2022;23(22):14304.

16. Tada M, Tada M. Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. **Biochim Biophys Acta**. 1976;454(3):558–66.
17. Li Q, Dong H, Yang G, Song Y, Mou Y, Ni Y. Mouse Tumor-Bearing Models as Preclinical Study Platforms for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Front Oncol**. 2020;10:212.
18. Sagheer SH, Whitaker-Menezes D, Han JYS, Curry JM, Martinez-Outschoorn U, Philp NJ. 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma. **Methods in Cell Biology**. Elsevier; 2021. p. 93–111.
19. Zheng D, Li Z. A sex-dimorphic mouse model of esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Cancer Res**. 2019;9(2):429–33.
20. Wang YT, Kuo LT, Weng HH, Hsu CM, Tsai MS, Chang GH, et al. Systemic Immune-Inflammation Index as a Predictor for Head and Neck Cancer Prognosis: A Meta-Analysis. **Front Oncol**. 2022;12:899518.
21. Jacobse J, Aziz Z, Sun L, Chaparro J, Pilat JM, Kwag A, et al. Eosinophils Exert Antitumorigenic Effects in the Development of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**. 2023;16(6):961–83.
22. Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1995;92(23):10688–92.
23. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clin Cancer Res**. 2004;10(1 Pt 1):301–13.
24. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. **J Pharmacol Pharmacother**. 2010;1(2):87–93.
25. Perez APS, Biancardi MF, Caires CRS, Falleiros-Junior LR, Góes RM, Vilamaior PSL, et al. Prenatal exposure to ethinylestradiol alters the morphologic patterns and increases the predisposition for prostatic lesions in male and female gerbils during ageing. **Int J Exp Pathol**. 2016;97(1):5–17.
26. Chen T, Stoner GD. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. **Mol Carcinog**. 2004;40(4):232–40.
27. Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. **Cancer Res**. 2004;64(10):3714–7.
28. de Faria PR, Chammas R, de Melo TL, Hsu DK, Liu FT, Nonogaki S, et al. Absence of galectin-3 does not affect the development of experimental tongue carcinomas in mice. **Experimental and Molecular Pathology**. 2011;90(2):189–93.
29. Ishida K, Tomita H, Nakashima T, Hirata A, Tanaka T, Shibata T, et al. Current mouse models of oral squamous cell carcinoma: Genetic and chemically induced models. **Oral Oncol**. 2017;73:16–20.

30. Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, Tajima T, Himeno S, Kenmochi T, et al. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. **Int J Oncol.**;14(6):1069–73.
31. Matsumoto M, Furihata M, Kurabayashi A, Araki K, Sasaguri S, Ohtsuki Y. Association between inducible nitric oxide synthase expression and p53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology.** 2003;64(1):90–6.
32. Rachidi S, Wallace K, Wrangle JM, Day TA, Alberg AJ, Li Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in all sites of head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck.** 2016;38(Suppl 1):E1068–74.
33. Scutti JAB, Pineda M, Emerick Jr E, Almeida ER de. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. **Revista da Associação Paulista de Cirurgias Dentistas.** 2016;70(2):156–63.
34. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front Physiol.** 2018;9:113.
35. Damar M, Dinç AE, Erdem D, Aydil U, Kizil Y, Eravcı FC, et al. Pretreatment Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Salivary Gland Tumors Is Associated with Malignancy. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2016;155(6):988–96.
36. 3IL-1 β transgenic mouse model of inflammation driven esophageal and oral squamous cell carcinoma. **Sci Rep.** 2023;13(1):12732.
37. Gresele P, Momi S, Malvestiti M, Sebastiano M. Platelet-targeted pharmacologic treatments as anti-cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev.** 2017;36(2):331–55.
38. Santos DO, Costa ARGF, Duarte PVS, Pitorro TEA, Fonseca LC, Cardoso SV, de Faria PR, Loyola AM. Depth of invasion of oral squamous cell carcinoma in Nos2-knockout mice correlated to alterations in systemic inflammatory markers following 4NQO treatment. **J Oral Pathol Med.** 2024 Mar;53(3):208-216.
39. COSTA, ARGF. **Ausência da óxido nítrico sintase induzível em modelo murino de carcinogênese bucal com N-óxido de 4-nitroquinolina: alterações em marcadores histopatológicos, inflamatórios sistêmicos e epigenéticos.** [tese] Uberlândia: FOUFU/UFU; 2022.



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito da Óxido Nítrico Sintase Induzível nos Mecanismos Genéticos e Epigenéticos de Diferentes Etapas da Carcinogênese Bucal Experimental Induzida por 4-NQO em Camundongos Nos2+/+ e Nos2-/-”, protocolo nº 100/18, sob a responsabilidade de **Adriano Mota Loyola** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **29 de Março de 2019**.

(We certify that the project entitled “Efeito da Óxido Nítrico Sintase Induzível nos Mecanismos Genéticos e Epigenéticos de Diferentes Etapas da Carcinogênese Bucal Experimental Induzida por 4-NQO em Camundongos Nos2+/+ e Nos2-/-”, protocol 100/18, under the responsibility of Adriano Mota Loyola - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 29th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 12/08/2019 Término: 01/02/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL/6/ Camundongo <i>Knockout</i> APPSw ^{DI} /NOS2-/-
Número de animais	180
Peso / Idade	20g – 25g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU)
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU)

Uberlândia, 15 de Abril de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão

Coordenador da CEUA

SEI Nº 1201, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2018