

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
ESTOMATOLOGIA**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CXCR2
PARA QUIMIOCIAS
NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

JULIANA ROMANINI

2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
ESTOMATOLOGIA

JULIANA ROMANINI

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CXCR2 PARA QUIMIOCINAS
NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Porto Alegre
2010

JULIANA ROMANINI

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CXCR2 PARA QUIMIOCINAS
NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia Clínica, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr^a. Maria Martha Campos
Orientadora
Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Jr.
Co-Orientador

Porto Alegre
2010

DEDICATÓRIA

Ao

Professor João Jorge Diniz Barbachan

Chefe!

Obrigada pela oportunidade do primeiro passo.

E de todo o caminho que se fez!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Mestra, com carinho!

Professora Maria Martha

*Tudo nessa vida vem no tempo certo...
Que bom que as pessoas também vêm!
Obrigada pela pessoa que és,
Ensinando como caminhar e,
principalmente, a enfrentar o caminho
com firmeza, correção,
muita dedicação e
amor.*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Quando comecei a pensar nos agradecimentos, percebi que os dias do doutorado passaram como uma longa história, repleta de belos personagens!

Papai do Céu, obrigada! Espero não esquecer nenhum detalhe!

*Meus Pais Ivete e Alci. Meu irmão Renato.
Minha Avó, Meus Dindos e Todos os Pais e Mães Postiços!
Obrigada pelo apoio incondicional.
Alexandre, pelo exercício da paciência.*

Professoras Liliane Yurgel, Maria Antonia Figueiredo, Karen Cherubini, Fernanda Salum: obrigada pela oportunidade de realizar, mais do que um objetivo profissional, um sonho: a Estomatologia!

Professores Manoel Sant'Ana e Pantelis V. Rados obrigada pelo contínuo estímulo desde o 'primeiro passo' e, mais ainda, pela amizade! E, em vocês, agradeço à toda Equipe da Patologia da PUC e da UFRGS: Vanessa, Fábio, Prof. Onofre, Isabel, Márcia, Vinicius, Manoela, Marco. Em algum momento, vocês fizeram participações especiais para que esse trabalho se realizasse!

Professora Fernanda Bueno Morrone: não tenho palavras suficientes para agradecer a acolhida no Laboratório de Farmacologia Aplicada! E que Família! Ajudando sempre que uma mão a mais foi necessária: André, Cacá, Fabiana, Izaque, Paulinha, Rodrigo, Jerônimo Vinícios, Vanessa, Verônika e todos: Iniciação Científica que vai formando, não só profissionais, mas pessoas excelentes! Não, não esqueci:

Tânia, foste muito mais que uma bolsista IC! Muito obrigada pelo teu tempo comigo! Às ordens, sempre que precisares!

Juliano, obrigada pelo carinho e atenção com os Fischer! Que tua mão abençoada encha de carinhos a Gatinha que chegou!

*Aline, Carla, Frederico, Nicole e Tatiana, muito bom ter vocês como colegas!
Professor Eraldo Batista Jr., na sua pessoa, obrigada a todos os professores que participaram da construção deste momento!*

Às Equipes: Prof. João Batista Calixto, da UFSC, e Prof. Décio Santos Pinto Jr., da USP, obrigada pelo apoio técnico na realização dos experimentos.

Meus queridos amigos e colegas de trabalho: da Odontologia Avançada, da Odontologia Sanmartin, do CS IAPI e do CEO Santa Marta! Muito obrigada por aceitarem e, talvez, entenderem meu jeito. Com isso, tornaram mais fáceis meu trabalho e minha vida!!

A todos que não foram citados, mas sei que participaram deste trabalho torcendo, rezando, cuidando, para que tudo desse certo!

Felizmente, não termina aqui!

Mais uma vez, muito obrigada!

***“Não basta viver,
é preciso contar da melhor forma
o que se viveu.”***

Carpinejar

O presente estudo avaliou o envolvimento dos receptores CXCR2 para quimiocinas, no carcinoma espinocelular oral, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. A incubação *in vitro* do antagonista seletivo não-peptídico dos receptores CXCR2, SB225002 (25 a 3200 nM), produziu uma inibição dependente do tempo e da concentração, da viabilidade das linhagens SCC158 e HN30, de carcinoma oral de células escamosas de ratos e humanos, respectivamente. Por outro lado, a incubação com este antagonista não produziu alteração significativa da viabilidade da linhagem HaCaT de queratinócitos humanos normais. O papel dos receptores CXCR2 foi ainda avaliado através da utilização dos agonistas seletivos para estes receptores em humanos (IL-8) e em ratos (CINC-1). Esta série de resultados demonstrou que a incubação de IL-8 (1 a 100 ng/ml) ou de CINC-1 (1 a 10 nM) produziu um aumento concentração-dependente da proliferação das linhagens celulares HN30 de humanos e SCC158 de ratos, respectivamente. A injeção submucosa de células SCC158 (5×10^6 células/sítio), na língua de ratos Fischer 344, induziu o desenvolvimento de carcinoma espinocelular oral, com características lembrando àquelas observadas clinicamente em humanos. O aumento tumoral foi evidente após sete dias da inoculação das células, sendo máximo em 40 dias. Depois desse período de tempo, o tamanho da lesão impediu que fossem continuados os experimentos. De forma interessante, a análise por imunistoquímica demonstrou um aumento marcante da expressão dos receptores CXCR2 na língua de ratos com tumor, independente do tempo de avaliação. O aumento da expressão dos receptores CXCR2 foi acompanhado de um aumento dos marcadores de angiogênese e apoptose, VEGF e caspase-3, respectivamente. Os dados do presente estudo sugerem um importante papel para os receptores CXCR2 no carcinoma oral de células escamosas. Estudos adicionais precisam ser realizados a fim de determinar o efeito do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores CXCR2, SB225002, no desenvolvimento tumoral *in vivo*.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular oral, quimiocinas, receptores CXCR2, VEGF, caspase-3.

ABSTRACT

The present study has evaluated the relevance of CXCR2 chemokine receptors in the oral squamous cell carcinoma, by means of *in vitro* and *in vivo* approaches. The *in vitro* incubation of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 (25 to 3200 nM) produced a time- and concentration-dependent inhibition of viability of the cell lines SCC158 e HN30, from rat and human origin, respectively. On the other hand, this antagonist failed to significantly affect the viability of the normal keratinocyte lineage HaCaT. The role of CXCR2 receptors was further confirmed by testing the effects of the selective human and rat agonists, IL-8 (1 to 100 ng/ml) and CINC-1 (1 to 10 nM), respectively. This series of results revealed a concentration-dependent increase of HN30 and SCC158 cell proliferation, respectively. The sub-mucosal injection of SCC158 cells (5×10^6 cells per site), into the tongue of Fischer 344 rats, induced tumor development, which displayed typical clinical features. The tumor growth was evident as early as seven days following cell inoculation, being maximal at 40 days. After this period, the lesion length did not allow continuing experiments. Of high interest, the immunohistochemical analysis of rat tongue biopsies revealed a marked increase of CXCR2 receptor expression in the tumor groups, independent on the time of evaluation. The up-regulation of CXCR2 receptors was accompanied by an expressive augmentation in the expression of the molecular markers of angiogenesis and apoptosis, VEGF and caspase-3, respectively. Our data suggests an important role for CXCR2 receptors in oral squamous cell carcinoma. Additional studies are needed to determine the effects of treatment with the selective CXCR2 chemokine receptor antagonist SB225002, on *in vivo* tongue carcinoma growth.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, chemokines, CXCR2 receptors, VEGF, caspase-3.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

C	Cisteína
Ca ⁺²	Íon cálcio
CINC	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant
CXCL8/IL-8	Interleucina-8
CXCR2	Receptor CXCR2 para quimiocinas
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
Cl ₅₀	Concentração do antagonista que produz 50 % de inibição da resposta máxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio por Enzimas Imuno-adsorvidas
ELR ⁺	Presença da sequência glutamato-leucina-arginina na quimiocina
ELR ⁻	Ausência da sequência glutamato-leucina-arginina na quimiocina
HaCaT	Linhagem de Células de Queratinócitos Humanos
HE	Coloração Hematoxilina e Eosina
HN30	Linhagem de Células de Carcinoma Espinocelular Oral Humano
HPV	Vírus do Papiloma Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	Intraperitoneal
JRCB	Japanese Collection of Research Bioresources
L	Ligante
Mg ⁺²	Íon magnésio
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio
NIH	National Institute of Health
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato – sem cálcio e magnésio
R	Receptor
SCC158	Linhagem Celular de Carcinoma Escamoso derivado do meato acústico externo de ratos Fischer 344
TNM	Sistema tumor-nodo-metástase de estadiamento
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
v/v	volume/volume
G	Gramas

Kg	Quilograma
ml	Mililitro
Mg	Miligrama
μ l	Microlitro
μ g	Micrograma
L	Litro
M	Molar
N	Normal
U/ml	Unidades/ml
μ M	Micromolar
Mm	Milimolar
μ L	Microlitro
μ M	Micrômetro
nM	Nanomolar
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
kD	Quilo-Dalton

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura das famílias de quimiocinas.	22
FIGURA 2	Receptor acoplado à proteína G para quimiocinas.	23
FIGURA 3	Ligações quimiocina-receptor.	28
FIGURA 4	Vias de atuação da IL-8/CXCL8 no microambiente tumoral.	31
FIGURA 5	Estrutura química do SB225002.	35
FIGURA 6	Linhagens celulares: SCC158 – carcinoma escamoso derivado do meato acústico externo de ratos Fischer 344; HN30 - Carcinoma espinocelular oral humano; HaCaT - queratinócitos humanos.	38
FIGURA 7	Preparo da Câmara de Neubauer e posicionamento ao microscópio ótico para a contagem das células.	39
FIGURA 8	Placas de cultura com 24 e 96 poços.	40
FIGURA 9	Frascos de 75 e 25 cm ³ e placas de cultura mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO ₂ .	40
FIGURA 10	Aspecto da placa após a técnica do MTT, imediatamente antes da quantificação em leitor de placas de 96 poços, em 595 nm.	42
FIGURA 11	Sequência do protocolo de injeção de 5x10 ⁶ células da linhagem SCC158 na borda da língua, lado esquerdo, do rato Fischer 344.	44
FIGURA 12	Preparo da peça para a histotécnica: aspecto macroscópico, plano de corte e posição de inclusão.	44
FIGURA 13	Exemplo de corte histológico da língua, coloração HE, apresentando tumor com sete dias desenvolvimento, indicando as regiões da análise microscópica descritiva (1) e também os pontos usados como referência nas tomadas de medida da língua (A) e do tumor (B).	45
FIGURA 14	Efeito da incubação <i>in vitro</i> com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da linhagem celular SCC158, oriunda de carcinoma de células escamosas de rato Fischer 344, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.	49
FIGURA 15	Efeito da incubação <i>in vitro</i> com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da linhagem celular HN30, oriunda carcinoma de células escamosas humano, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.	50
FIGURA 16	Efeito da incubação <i>in vitro</i> com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da	51

linhagem celular HaCaT, queratinócitos humanos imortalizados, nos tempos de 24h, 48h e 72h. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

FIGURA 17	Efeito da incubação in vitro com o agonista CINC-1 para o receptor CXCR2 sobre a proliferação da linhagem celular SCC158, oriunda de carcinoma de células escamosas de rato, em 24h. C = controle PBS. Cada coluna representa a média de um experimento realizado em triplicata.	53
FIGURA 18	Efeito da incubação in vitro com o agonista IL-8 para o receptor CXCR2 sobre a proliferação da linhagem celular HN30, oriunda de carcinoma de células escamosas humano, em 24h. C = controle PBS. Cada coluna representa a média de dois experimentos realizados em triplicata.	53
FIGURA 19	Evolução clínica do modelo experimental de carcinoma de células escamosas em língua de ratos Fischer 344, após 7, 14, 21, 28, 40 dias da indução do tumor (\Rightarrow) pela injeção submucosa de 5×10^6 células por sítio, em 50 μ L de PBS, na região lateral esquerda da língua.	55
FIGURA 20	Aumento da vascularização (\Rightarrow) na periferia do tumor em língua de ratos Fischer 344, 40 dias após a indução do tumor na região lateral esquerda da língua.	56
FIGURA 21	Aspecto microscópico do modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas (\Rightarrow), conforme o período estudado. Áreas de degeneração (D), necrose (N), ulceração superficial (U). Microscópio estereoscópico. Aumento de 8X. HE.	57
FIGURA 22	Tamanho do tumor do modelo experimental de carcinoma de células escamosas em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias. A medida foi obtida em sua maior extensão em relação ao tamanho da língua, no corte transversal. Cada coluna representa a média de três medidas em cada tempo de experimento. Os resultados são expressos em porcentagem.	58
FIGURAS 23A a 23F	Fotomicrografias apresentando as características de malignidade, segundo os critérios adaptados para este estudo, nas lesões desenvolvidas pelos ratos Fischer 344 após a indução tumoral.	59 a 60
FIGURA 24	Expressão do receptor CXCR2 para quimiocinas no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.	61
FIGURA 25	Expressão do receptor CXCR2 (\Rightarrow) para quimiocinas no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas de língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias de experimento. Nos ratos sem tumor, observa-se a expressão do receptor no vaso sanguíneo (A) enquanto que não há expressão nas células epiteliais normais. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico; 400X. Técnica Imunoistoquímica.	62

FIGURA 26	Expressão da caspase-3 no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunohistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.	63
FIGURA 27	Expressão da caspase-3 (\Rightarrow), marcador de apoptose celular, no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas de língua, em ratos F344, nos tempos de 7, 14, 21, 28, 40 dias de experimento. Não houve marcação no rato sem tumor (A). Fotomicrografia obtida em microscópio óptico; aumento de 400X. Técnica de Imunohistoquímica.	64
FIGURA 28	Expressão do VEGF no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas de língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunohistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.	65
FIGURA 29	Expressão do VEGF (\Rightarrow), marcador de angiogênese, no modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias de experimento. No rato sem tumor houve marcação nos vasos (A) enquanto que nos demais tempos observa-se também a expressão de VEGF nas células tumorais (\Rightarrow). Fotomicrografia em microscópio óptico; aumento de 400X. Técnica de Imunohistoquímica.	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Família das quimiocinas CC e seus receptores.	24
QUADRO 2	Família das quimiocinas CXC e seus receptores.	26
QUADRO 3	Família das quimiocinas XC e CX ₃ C e seus receptores.	27
QUADRO 4	Crítérios de malignidade do carcinoma oral de células escamosas adaptado de Anneroth et al., 1986 ao modelo experimental desenvolvido.	45
TABELA 1	Percentagens de inibição para o SB225002 sobre a viabilidade celular, através do ensaio de MTT, nas linhagens SCC158 e HN30, de carcinoma de células escamosas de rato e humanos, respectivamente.	52

INTRODUÇÃO _____	17
REVISÃO DA LITERATURA _____	19
1. Câncer Oral _____	19
2. Quimiocinas _____	21
3. Inflamação, Câncer e Quimiocinas _____	29
4. Receptores CXCR e Câncer _____	31
5. Antagonista SB225002 _____	34
OBJETIVOS _____	37
Objetivo Geral _____	37
Objetivos Específicos _____	37
METODOLOGIA _____	38
LINHAGENS CELULARES _____	38
ESTUDOS <i>IN VITRO</i> _____	39
1. Cultura de células _____	39
2. Protocolos de incubação com o SB225002 _____	40
3. Protocolos de incubação com o IL-8 e CINC-1 _____	41
4. Ensaio de viabilidade celular _____	41
ESTUDOS <i>IN VIVO</i> _____	42
1. Animais _____	42
2. Caracterização do modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua de rato _____	43
3. Análise histopatológica _____	44
4. Análise imunoistoquímica _____	46
ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	47
RESULTADOS _____	48
ESTUDOS <i>IN VITRO</i> _____	48
ESTUDOS <i>IN VIVO</i> _____	54
DISCUSSÃO _____	67
CONCLUSÕES _____	77
REFERÊNCIAS _____	78

INTRODUÇÃO

Câncer oral é uma denominação usada para diferentes neoplasias malignas tanto em cavidade oral como em orofaringe. Dentro deste grupo, o carcinoma espinocelular é o tipo mais comum e representa mais de 90% dos casos (INCA, 2002; WHO, 2005; Brinkman e Wong, 2006). Estas neoplasias são consideradas um problema de saúde pública no Brasil e em muitos outros países e, embora variem em diferentes regiões do mundo, os maiores índices da doença são verificados em países em desenvolvimento (Brinkman e Wong, 2006; McDowell, 2006; INCA, 2008). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa atual aponta mais de 14.000 novos casos por ano, mantendo a proporção homem/mulher em torno de 3:1 (INCA, 2008).

Apesar dos avanços significativos no tratamento de outros tipos de neoplasias, a morbidade e mortalidade associadas ao câncer oral continuam elevadas. O prognóstico favorável ocorre principalmente com o diagnóstico precoce das lesões que, juntamente com a prevenção, segue sendo a melhor abordagem (Brinkman e Wong, 2006; Massano, 2006; McDowell, 2006). Geralmente, o tratamento padrão do carcinoma espinocelular compreende remoção cirúrgica e radioterapia ou a combinação de ambas (INCA, 2001; Rapaport et al., 2001; Cochrane, 2007). A quimioterapia pode ser empregada nos casos avançados visando à redução do tumor, previamente ao tratamento padrão ou como tratamento paliativo, diferentemente do que ocorre no tratamento de outros tumores. Em função da extensão da lesão, o tratamento deste grupo de neoplasias pode produzir alterações funcionais e estéticas significativas, determinando um grande impacto na qualidade de vida do paciente (Chandu et al., 2006). A pequena variação no tratamento do paciente com carcinoma espinocelular motiva a realização de novos estudos que identifiquem fatores que possam melhorar tanto abordagem individual quanto a terapia (Massano, 2006).

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) e seus receptores possuem ações fundamentais na patogênese de diversas doenças. Inicialmente, foram estudadas em função do seu papel na inflamação. A interação das quimiocinas com seus receptores leva à ativação de diversas vias de sinalização intracelular (Rosenkilde e Schwartz, 2004; Charo e Ransolhoff, 2006; Rollins, 2006). Por exemplo, de forma

geral, a família das quimiocinas CXC induz à migração de neutrófilos e linfócitos (Le et al., 2004) e pode influenciar funções angiogênicas e angiostáticas (Strieter et al., 2006). O protótipo desse grupo é a interleucina 8 (IL-8/CXCL8) (Holmes et al., 1991; Van Damme et al., 2004; White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006). Neste contexto, tem sido sugerido que agentes capazes de bloquear os receptores de quimiocinas, como o CXCR2, poderiam constituir uma nova classe de medicamentos, reduzindo as respostas inflamatórias e algicas em diferentes situações clínicas (Baggiolini, 2001; Gerard e Rollins, 2001; Le et al., 2004; White et al., 2005).

A relação entre inflamação e câncer já havia sido descrita no final do Século XIX, por Virchow (Coussens e Werb, 2002; Rosenkilde e Schwartz, 2004). Embora seja claro que a proliferação celular, por si só, não causa câncer, diversos estudos vêm ampliando o conceito de que a inflamação é um componente crítico na formação do tumor, chamando à atenção o microambiente tumoral, onde as células inflamatórias parecem exercer um papel fundamental no processo de proliferação, sobrevivência e migração da neoplasia (Desbaillets et al., 1997; Coussens e Werb, 2002). Além disso, as células tumorais podem expressar moléculas sinalizadoras das para invasão, migração e metástase, incluindo as quimiocinas e seus receptores (Coussens e Werb, 2002; Balkwill, 2003; Rosenkilde e Schwartz, 2004).

As diversas evidências experimentais sugestivas do envolvimento quimiocinas CXC, bem como de seus receptores, nos processos de oncogênese estimularam outros estudos a fim de identificar antagonistas dos receptores de quimiocinas como possíveis alternativas para a terapia do câncer (Hidaka et al., 2002). Em um dos principais estudos, o antagonista SB225002 diminuiu a proliferação de células de carcinoma de esôfago em cultura, sugerindo que o bloqueio dos receptores CXCR2 poderia representar uma estratégia potencial para o tratamento do câncer (Wang et al., 2006).

Assim, um novo paradigma vem sendo amplamente aceito: a inflamação crônica regulada por quimiocinas no local do tumor pode facilitar sua progressão, ao invés de promover imunidade antitumoral. A quebra desse ciclo, inibindo citocinas, quimiocinas e outros mediadores, isoladamente ou em uma combinação de terapias, poderia determinar regimes terapêuticos eficazes no tratamento das neoplasias (Yan et al., 2006).

1 Câncer Oral

Câncer oral é uma denominação usada para diferentes neoplasias malignas tanto em cavidade oral como em orofaringe. Dentro deste grupo, o carcinoma espinocelular é o tipo mais comum e representa mais de 90% dos casos (WHO, 2005; INCA, 2008). Este grupo de neoplasias é um problema de saúde pública no Brasil e em muitos outros países. Embora a incidência e a mortalidade por câncer oral variem em diferentes regiões do mundo, os maiores índices da doença são verificados em países em desenvolvimento (Danaei et al., 2005; Brinkman e Wong, 2006; McDowell, 2006; INCA, 2008). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas no Brasil indicam que as neoplasias malignas da cavidade oral apresentam-se como quinto grupo mais frequente entre os homens e o sétimo entre as mulheres. A estimativa atual aponta mais de 14.000 novos casos por ano, mantendo a proporção homem/mulher em torno de 3:1 (INCA, 2008).

O carcinoma espinocelular oral é causado por uma combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos (radiação solar, tabaco, álcool, suscetibilidade genética, entre outros) que atuam em conjunto durante um período de tempo para o início de uma neoplasia (Danaei et al., 2005; McDowell, 2006). Isto envolve a interação do carcinógeno com o DNA da célula a ele exposta determinando uma mutação. Esta célula permanece latente, podendo ser eliminada do organismo ou vir a proliferar quando forem ultrapassados seus mecanismos de regulação e controle (Coussens e Werb, 2002; Brinkman e Wong, 2006).

As localizações preferenciais do carcinoma espinocelular são língua, lábio inferior e soalho, podendo ocorrer em qualquer parte da cavidade oral (Rapaport et al., 2001; Silverman et al., 2004). Clinicamente, a lesão típica de carcinoma espinocelular tende a assumir um aspecto proliferativo ou de uma ulceração endurecida, assintomática, com bordas elevadas, que não cicatriza. Pode também se desenvolver a partir de lesões pré-existentes, em forma de leucoplasias, eritroplasias e ulcerações (Pindborg, 1997; Neville et al., 2004; Silverman et al., 2004; WHO, 2005).

O carcinoma espinocelular ocorre a partir do epitélio de revestimento da cavidade oral e seu aspecto histopatológico se caracteriza por ilhas e cordões de

células epiteliais malignas, lembrando a morfologia das células escamosas, que invadem os tecidos adjacentes. Tanto os tumores superficiais quanto os invasivos apresentam graus variados de pleomorfismo celular e nuclear, produção de pérolas de ceratina e inflamação. Esta variação na diferenciação determina a graduação histopatológica do tumor: bem diferenciado a pobremente diferenciado – Graus I a IV (Anneroth et al., 1986; Odell et al., 1994; Pindborg, 1997; WHO, 2005; Lourenço et al., 2007).

Assim como outras neoplasias, o carcinoma espinocelular oral também é estadiado clinicamente para estabelecer as bases do tratamento. O sistema usado na maioria dos centros é a classificação TNM – tumor-nodo-metástase, onde T indica o tamanho do tumor, N a presença ou ausência de lesões metastáticas nos linfonodos e M refere-se a metástases distantes (INCA,2002; Silverman et al., 2004; WHO, 2005). Entretanto, as evidências demonstram que esse sistema é insuficiente para determinar o prognóstico de pacientes com carcinoma oral. Em função disso, tem-se buscado meios de identificar quais são os indivíduos suscetíveis, de aumentar o diagnóstico precoce e de reduzir o atraso na referência dos pacientes com câncer para o tratamento adequado (Kademani et al., 2005; Brinkman e Wong, 2006; McLeod, 2006). A sobrevivência do paciente com carcinoma espinocelular varia conforme a localização topográfica primária. As recidivas ocorrem principalmente nos primeiros 2 a 3 anos, sendo o período de risco de 5 anos. As taxas de cura para esta neoplasia estão relacionadas ao estágio do tumor - lesões em estágio inicial podem ter 95% de chances de cura (INCA,2002; Chandu et al., 2005; Massano et al., 2006; Bell et al., 2007).

Os fatores que influenciam a escolha do tratamento estão relacionados com as características do tumor e do paciente. O objetivo final do tratamento é erradicar o tumor, preservar ou restaurar forma e função, minimizar as sequelas do tratamento e evitar qualquer novo tumor primário. Para atingir estes objetivos, as modalidades de tratamento disponíveis atualmente incluem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, tratamentos combinados e estratégias de prevenção incluindo estilo de vida e quimioprevenção (Rapaport et al., 2001; INCA, 2002; Neville et al., 2004; Chandu et al., 2005; Shah e Gil, 2009). A quimioterapia pode ser empregada nos casos avançados visando à redução do tumor, a fim de possibilitar o tratamento posterior pela radioterapia ou cirurgia. Nesses casos, o

prognóstico é extremamente grave, pois, em função da extensão, o controle da lesão é limitado, independentemente do tratamento utilizado. Muitas vezes, nos casos de câncer de cabeça e pescoço, a quimioterapia é paliativa, ao contrário do que ocorre no tratamento de outros tumores. A quimioterapia pode ser realizada com um único agente ou por uma combinação deles, o que aumenta a taxa de resposta, embora a toxicidade também seja maior, sem que se tenham evidências convincentes do aumento da sobrevida. Alguns dos agentes usados atualmente, como a cisplatina e 5-fluorouracil, buscam reduzir o tumor através do controle local e também de metástases (Cochrane, 2007; Tsuji et al., 2007; Zima et al., 2007).

A permanência dos elevados índices de morbi-mortalidade e a pequena variação na terapia motiva a realização de novos estudos em busca de uma melhor abordagem individual do paciente com câncer oral (Massano, 2006).

2 Quimiocinas

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) representam um grupo de pequenas proteínas, que estão implicadas em uma série de processos biológicos, especialmente aqueles relacionados à movimentação dos leucócitos e sua migração do sangue para os tecidos, locais de inflamação ou lesões, a partir da ativação dos receptores de quimiocinas (Rosenkilde e Schwartz, 2004). Inicialmente estudadas em função do seu papel na inflamação, as quimiocinas e seus receptores possuem ações fundamentais na circulação das células mononucleares pelo corpo, na organização do sistema imune e na patogênese de diversas doenças (Slettenaar e Wilson, 2006). Além de células hematopoiéticas, células endoteliais, musculares, epiteliais, entre outras, expressam os receptores para quimiocinas (Rosenkilde e Schwartz, 2004). Em razão disso, diferentes antagonistas dos receptores de quimiocinas vêm sendo desenvolvidos com o intuito de modular a inflamação e a resposta imune (Ben-Baruch, 2006; Charo e Ransohoff, 2006).

As quimiocinas humanas são um grupo de aproximadamente 50 moléculas. Representam polipeptídeos de 8-kD a 12-kD, com 67 a 127 aminoácidos, que contém duas alças dissulfeto internas. São organizados em quatro famílias com base na disposição dos dois resíduos de cisteína amino-terminais que integram as pontes de dissulfeto (FIGURA 1). Esses resíduos de cisteína podem estar

imediatamente adjacentes (quimiocinas CC) ou separados por um aminoácido qualquer (quimiocinas CXC). Existem ainda as quimiocinas XC e as quimiocinas CX₃C, que ocorrem em menor número (Baggiolini, 1997; Baggiolini, 2001; Frederick e Clayman, 2001; Le et al., 2004; Moser e Williman, 2004; Slettenaar e Wilson, 2006). A nomenclatura é determinada pela estrutura (CC, CXC, XC e CX₃C) seguida de L (para ligante) e um número (Murphy et al., 2000; Baggiolini, 2001).

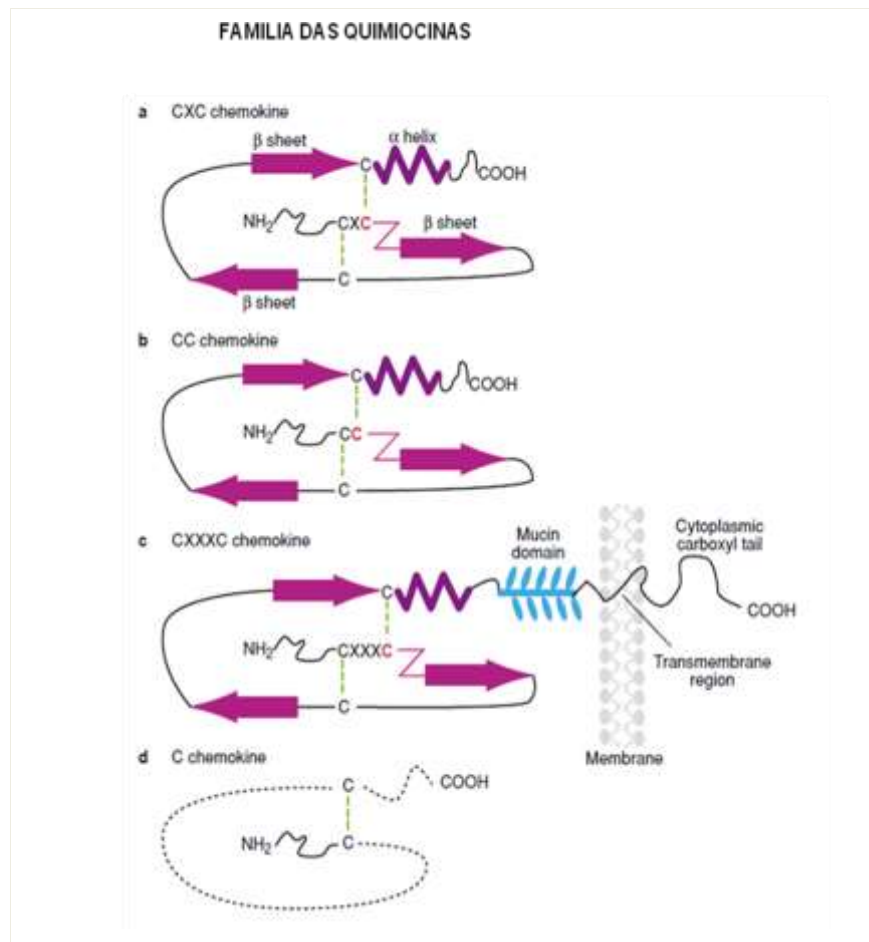


FIGURA 1. Estrutura das famílias de quimiocinas (Adaptado de Frederick & Clayman, 2001).

A diferença estrutural entre as quimiocinas influencia diretamente a ligação aos receptores (White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006). Os principais efeitos das quimiocinas são mediados pela interação com diversos receptores acoplados à proteína G, que possuem sete domínios transmembrânicos (FIGURA 2). A interação das quimiocinas com seus receptores leva à ativação de diversas vias de sinalização intracelular, o que resulta no influxo de Ca⁺⁺ e no rearranjo da actina celular, promovendo, finalmente, quimiotaxia (Rosenkilde e Schwartz, 2004; Charo e

Ransohoff, 2006). Os receptores de quimiocinas são divididos em famílias diferentes, de acordo com o tipo de quimiocinas a que se ligam (Baggiolini, 2001; White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006). A nomenclatura é definida como CC, CXC, C, ou CX₃C, seguidas de R (para receptor) e um número (Murphy et al., 2000; Baggiolini, 2001).

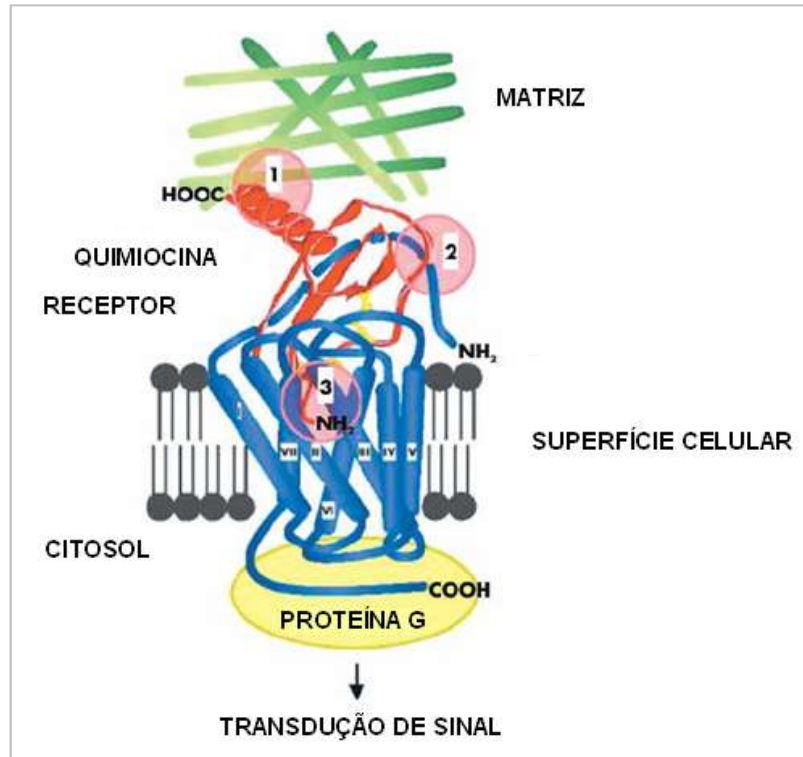


FIGURA 2. Receptor acoplado à proteína G para quimiocinas. A figura ilustra a interação quimiocina-receptor: (1) indica o sítio de fixação à matriz da porção C-terminal da quimiocina; (2) mostra a alça que permite o contato inicial da quimiocina com o receptor; (3) representa a porção N-terminal que interage com o sítio de ligação formado pelas regiões transmembranares do receptor (Adaptado de Moser e Williman, 2004).

As quimiocinas CC apresentam duas cisteínas adjacentes e têm a função de atrair células mononucleares aos locais de inflamação crônica. O representante principal deste grupo é a quimiocina MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), chamada atualmente de CCL2, que induz os monócitos a deixarem a corrente sanguínea em direção ao tecido adjacente, tornando-se macrófagos teciduais. A MCP-1 é um potente agonista para monócitos, células dendríticas, linfócitos T de memória e basófilos. Entre outras, algumas quimiocinas CC de relevância são CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES (Bone-Larson et al., 2000; Ben-Baruch, 2006). Estas quimiocinas CC se unem a receptores CC, identificados até agora como CCR1 a CCR10, sendo expressos na superfície de diferentes células (White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006) (QUADRO 1).

QUADRO 1. Família das quimiocinas CC e seus receptores.

NOME ATUAL	ABREVIATURA E NOME ANTERIOR	RECEPTOR	CÉLULA ALVO
CCL1	I-309	CCR8	MO, T
CCL2	MCP-1	CCR2	MO,T,Ba,NK, P
CCL3	MIP-1 ^a	CCR1,CCR5	MO,T, Ba,NK, H,E, D, P
CCL4	MIP-1b	CCR5	MO,T,NK,D,P
CCL5	RANTES	CCR1,CCR3 CCR5	T, Ba, NK,MA,E.D,P
CCL6		CCR1,CCR2 CCR3	MA
CCL7	MCP-3	CCR1,CCR2 CCR3	MO, T, NK, D, E, BA
CCL8	MCP-2		MO, T, NK, E, Ba
CCL9/10		CCR1	T
CCL11	Eotaxin	CCR3	E,T
CCL12		CCR2	MO, E, T
CCL13	MCP-4	CCR1,CCR2 CCR3	MO, E, T
CCL14	HCC-1	CCR1	MO, H
CCL15	HCC-2	CCR1,CCR3	MO, E, T
CCL16	HCC-4	CCR1	T, N
CCL17	TARC	CCR4	T
CCL18	PARC	Desconhecido	T naive
CCL19	ELC	CCR7	T, B, D, NK ativadas
CCL20	LARC	CCR6	T e B
CCL21	SLC	CCR7	T, B, D, A,P, NK ativadas
CCL22	MDC	CCR4	MA, P.
CCL23	MPIF-1	CCR1	D, Oc
CCL24	MPIF-2	CCR3	Th2 efetoras
CCL25	TECK	CCR9	T e T Mem., B, timócitos imaturos, E
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	E, T
CCL27	ESkine	CCR3,CCR2 CCR1	T CLA+
CCL28	MEG	CCR10, CCR3	T

MO=Monócitos, MA=macrófagos T=células T, B=células B, Ba=basófilo, NK=Células NK, P=progenitoras, H=hematopoiéticas, E=eosinófilos, D=dendríticas, T, N=neutrófilos, Oc=osteoclastos, CE =células endoteliais, F=fibroblastos, nH=não hematopoiéticas.

Adaptadas de Rosenkilde e Schwartz, 2004; Le et al., 2004; Charo e Ransohoff, 2006. Os nomes foram mantidos em inglês em virtude da nomenclatura oficial.

Nas quimiocinas CXC as cisteínas são separadas por um aminoácido (X). Podem também ser classificadas como ELR⁺ e ELR⁻, em função da sequência específica ELR (glutamato-leucina-arginina), que pode estar presente imediatamente antes da primeira cisteína. A presença dessa sequência de aminoácidos influencia as funções angiogênica (CXC ELR⁺) e angiostática (CXC ELR⁻) das quimiocinas do grupo (Strieter et al., 2006). De forma geral, as quimiocinas CXC induzem à migração de neutrófilos e linfócitos (Baggiolini et al., 1997; Le et al., 2004). O protótipo desse grupo é a interleucina 8 (IL-8/CXCL8), uma quimiocina ELR⁺, que possui a função de atrair leucócitos polimorfonucleares para os sítios de inflamação aguda. Além disso, ativam monócitos e podem direcionar estas células para lesões vasculares, levando à proliferação de células endoteliais (Van Damme et al., 2004; White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006). Nos ratos e camundongos, uma das quimiocinas CXC pró-inflamatórias, funcionalmente equivalente à IL-8 humana, é a CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*), com características similares de quimiotaxia para neutrófilos e união e ativação ao receptor CXCR2 (Podolin et al., 2002; Vanderbilt et al., 2003).

Outros exemplos desse grupo são CXCL1/GRO- α e CXCL2/GRO- β . Essa classe de quimiocinas se une aos receptores CXC, dos quais sete já foram identificados e denominados CXCR1 a CXCR7. São expressos em diferentes células, apresentando seletividade para determinadas quimiocinas. Os receptores CXCR1 e CXCR2, ambos expressos na superfície de neutrófilos, apresentam alta homologia. Esses receptores interagem com a IL-8/CXCL8 e com outras quimiocinas ELR⁺. O receptor CXCR2 se liga também à CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ , CXCL5/ENA-78 e CXCL6 (Bone-Larson et al., 2000; White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006) (QUADRO 2).

QUADRO 2. Família das quimiocinas CXC e seus receptores.

NOME ATUAL	ABREVIATURA E NOMENCLATURA ANTERIOR	RECEPTOR	CÉLULAS ALVO
CXCL1	GRO- α Growth-related oncogene α	CXCR2, CXCR1	N, CE
CXCL2	GRO- β Growth-related oncogene β	CXCR2	N, CE
CXCL3	GRO- γ Growth-related oncogene γ	CXCR2	N
CXCL4	PF-4 Platelet factor-4	Desconhecido	F, CE
CXCL5	ENA-78 Epithelial cell-neutrophil-activating factor 78	CXCR1,CXCR2	N
CXCL6	CGP-2 Granulocyte chemoattractant protein-2	CXCR1,CXCR2	N
CXCL7	NAP-2 Neutrophil-activating protein-2	CXCR1,CXCR2	F
CXCL8	IL-8/CINC-1 Interleukin-8/Cytokine-induced neutrophil chemoattractant	CXCR1,CXCR2	N,CE, T, B
CXCL9	Mig Monokine induced by γ -interferon	CXCR3	T, P
CXCL10	IP-10 γ -interferon – inducible protein 10	CXCR3	T
CXCL11	ITAC Interferon-inducible T-cell α - chemoattractant	CXCR3	T
CXCL12	SDF-1 Stromal cell-derived factor-1	CXCR4	MO, B, H, P, Nh
CXCL13	BCA B-cell-activating chemokine 1	CXCR5	B
CXCL14	BRAK Breast and kidney chemokine	Desconhecido	N, NK
CXCL15		Desconhecido	N
CXCL16	SR-PSOX Scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein	CXCR6	D

MO=Monócitos, MA=macrófagos T=células T, B=células B, Ba=basófilo, NK=Células NK, P=progenitoras, H=hematopoiéticas, E=eosinófilos, D=dendríticas, N=neutrófilos, CE =células endoteliais, F=fibroblastos, nH=não hematopoiéticas.

Adaptadas de Rosenkilde e Schwartz, 2004; Le et al., 2004; Charo e Ransohoff, 2006. Os nomes foram mantidos em inglês em virtude da nomenclatura oficial.

Nas quimiocinas CX₃C existem três aminoácidos entre as duas cisteínas; o domínio dessas quimiocinas é unido a uma haste *mucin-like* e a uma região transmembrânica e citoplasmática, o que permite a retenção de células sob fluxo fisiológico. O único membro bem caracterizado desta família é a CX₃CL1, também chamado de fractalina. Pode ser tanto secretada quanto expressa na membrana plasmática, servindo como quimioatraente e mediando a adesão celular. Pode sofrer ação da enzima TNF α -convertase, que a torna solúvel. O único receptor CX₃C é o CX₃CR1, que se une à fractalina (CX₃CL1), cuja expressão está associada à quimiotaxia e à adesão celular na própria célula em que é produzida (Le et al., 2004; White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006) (QUADRO 3).

As quimiocinas XC possuem uma única cisteína residual, XCL, sendo as linfotactinas (1 e 2) os únicos representantes bem caracterizados da família. Esta quimiocina tem a função de atrair células T precursoras para o timo. O receptor de

quimiocina C é o XCR1, para as linfotactinas 1 e 2 (XCL1 e XCL2) (White et al., 2005; Charo e Ransohoff, 2006) (QUADRO 3).

QUADRO 3. Família das quimiocinas XC e CX₃C e seus receptores.

NOME ATUAL	NOME ANTERIOR	RECEPTOR	CÉLULAS ALVO
XCL1	Lymphotactin- α	XCR1	B, T, NK, N
XCL2	Lymphotactin- β	XCR1	B, T, NK, N
CX ₃ CL1	Fractalkine	CX ₃ CLR 1	Células T efetoras

T=células T, B=células B, Ba=basófilo, NK=Células NK, N=neutrófilos.

Adaptadas de Rosenkilde e Schwartz, 2004; Le et al., 2004; Charo e Ransohoff, 2006. Os nomes foram mantidos em inglês em virtude da nomenclatura oficial.

Um único receptor pode ser ativado por diferentes quimiocinas dentro de uma mesma subfamília, o que reflete uma superposição de seletividade. Há uma redundância nas ligações quimiocina-receptor, uma vez que um receptor pode reconhecer mais do que uma quimiocina. Ainda, alguns receptores podem se ligar tanto quimiocinas CXC como CC, de modo semelhante (FIGURA 3). O padrão da expressão celular dos receptores determina quais os tipos de células respondem a determinadas quimiocinas. Os receptores de quimiocinas podem ser regulados negativamente (dessensibilização) pela exposição contínua a quimiocinas, sendo este o mecanismo provável de finalização das respostas iniciadas por esses fatores quimiotáticos (Gerard e Rollins, 2001; Le et al., 2004; Slettenaar e Wilson, 2006).

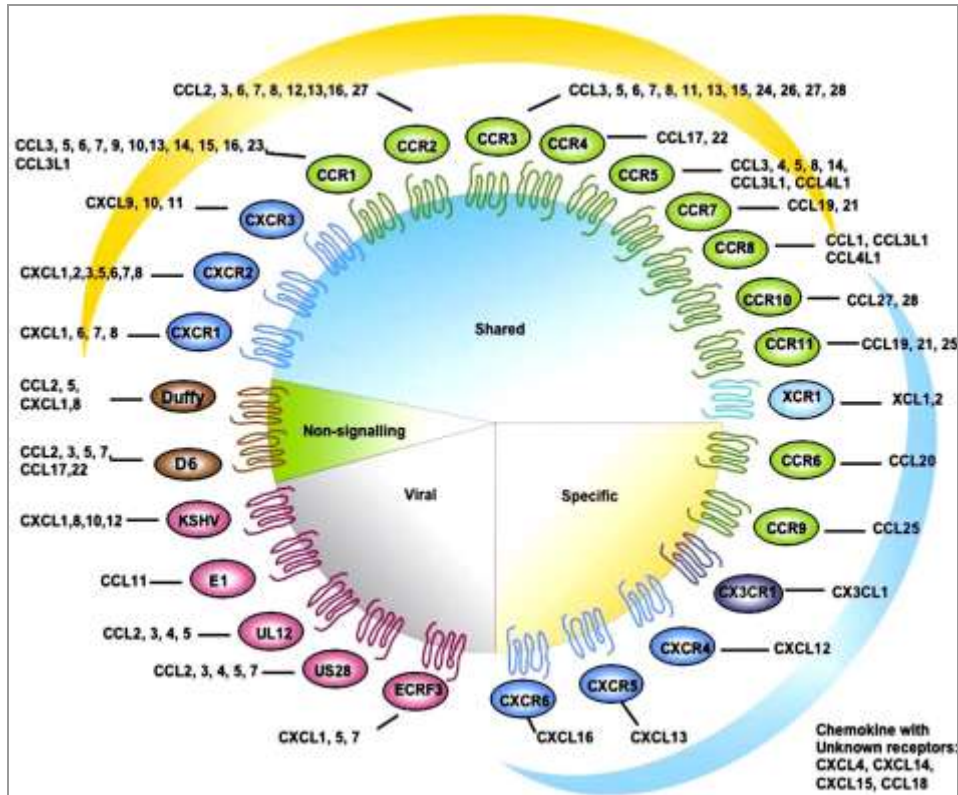


FIGURA 3. Ligações quimiocina-receptor. Slettenaar e Wilson, 2006.

A identificação das quimiocinas ocorreu em função das suas atividades quimioatraentes sobre leucócitos. Entretanto, já são conhecidas outras importantes funções para estas moléculas sobre o sistema imune e outros sistemas. Como diferentes quimiocinas atuam sobre tipos celulares distintos, há um controle da natureza do infiltrado inflamatório: assim a CXCL8 recruta neutrófilos, enquanto a CC eotaxina atrai eosinófilos. Além disso, as quimiocinas regulam o trânsito dos linfócitos e outros leucócitos em órgãos linfóides periféricos. Por exemplo, foi identificada a quimiocina que dirige a entrada dos linfócitos B no folículo linfóide. A deleção do gene que codifica o receptor para essa quimiocina, o CXCR5, resulta na ausência de linfócitos B nos órgãos linfóides. Esses papéis das quimiocinas indicam a possibilidade de outras funções em condições fisiopatológicas, como o desenvolvimento de órgãos, angiogênese/angiostase, tumorigênese e metástase (Le et al., 2004). De forma interessante, a expressão de algumas quimiocinas, como a CXCL8/IL-8 e CXCL3/GRO- γ foi identificada na mucosa bucal em condições fisiológicas (Zehnder et al., 1999).

O papel das quimiocinas já foi descrito em doenças auto-imunes (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico); rejeição de transplantes (rim, coração);

infecções (agudas e crônicas, tanto bacterianas como virais); inflamação e alergias (asma, artrite, psoríase), neoplasias (pâncreas, esôfago, próstata, melanoma, fígado, pulmão) e doenças vasculares (aterosclerose, hipertensão) (Gerard e Rollins, 2001; Moser e Williman, 2004; Aggarwal et al., 2006; Richmond et al., 2009). Neste contexto, tem sido sugerido que agentes capazes de bloquear os receptores de quimiocinas (antagonistas) poderiam constituir uma nova classe de medicamentos, reduzindo as respostas inflamatórias e álgicas em diferentes situações clínicas (Baggiolini, 2001; Gerard e Rollins, 2001; Le et al., 2004; White et al., 2005), inclusive no tratamento isolado ou combinado das neoplasias de cabeça e pescoço (Wang et al., 2009 b).

3 Inflamação, Câncer e Quimiocinas

A relação entre inflamação e câncer já havia sido descrita no final do Século XIX, por Virchow, cuja hipótese era de que o câncer se originava em locais de inflamação crônica, onde a associação de fatores irritantes e do dano tecidual com a própria inflamação determinaria um aumento da proliferação celular (Balkwill e Mantovani, 2001; Coussens e Werb, 2002; Rosenkilde e Schwartz, 2004). Estimativas recentes sugerem que 15 a 20 % das mortes por câncer estão associadas com a existência prévia de reações inflamatórias e/ou infecciosas (Mantovani e Pierotti, 2008).

Diversos estudos vêm ampliando o conceito de que a inflamação é um componente crítico de progressão do tumor. Atenção maior tem sido dada ao microambiente tumoral, onde as células inflamatórias parecem exercer um papel fundamental no processo de proliferação, sobrevivência e migração da neoplasia (Desbaillets et al., 1997; Coussens e Werb, 2002; Mantovani e Pierotti, 2008). Além disso, tanto as células tumorais como seu estroma e infiltrado celular, podem expressar moléculas sinalizadoras para invasão, migração e metástase, incluindo as quimiocinas e seus receptores (Coussens e Werb, 2002; Balkwill, 2003; Rosenkilde e Schwartz, 2004; Wang et al., 2009 a).

Sob certas condições ambientais, a inflamação representa os primeiros esforços do indivíduo para combater a instalação do tumor (Ben-Baruch, 2006). Nos casos de tumores imunogênicos ou quando há uma sinalização imune adicional ou, ainda, alguma agressão sobreposta ao tumor, como nos casos de infecção e

necrose a migração de leucócitos pode ser considerada benéfica. Além disso, muitos dos tratamentos do câncer, como quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, induzem necrose e sinais inflamatórios. Ou seja, diversas situações ocorrem no ambiente do tumor levando à ação das quimiocinas, com o recrutamento de células que podem ser prejudiciais para o tumor e benéficas para o hospedeiro. Ademais, quando nenhuma sinalização acontece, leucócitos são recrutados para o tumor, talvez com a função de eliminá-lo pela ação do sistema imune. Por outro lado, em tumores invasivos, o que se observa são níveis mais altos de quimiocinas, sugerindo que as células tumorais produzem quimiocinas ou são responsivas a algum tipo de quimiocina (Opdenakker e Van Damme, 2004). De fato, foi observado que as quimiocinas e seus receptores são produzidos por células de diferentes linhagens tumorais (Kershaw et al., 2002; Kakinuma e Hwang, 2006).

Assim, um novo paradigma vem sendo amplamente aceito: a inflamação crônica regulada por quimiocinas no local do tumor pode facilitar sua progressão, ao invés de promover imunidade antitumoral. Tanto células tumorais como células do estroma são capazes de produzir quimiocinas e citocinas, que agem direta ou indiretamente ativando o endotélio vascular e recrutando leucócitos para o tumor. Depois da ativação, os leucócitos liberam fatores angiogênicos, mitogênicos, enzimas proteolíticas e fatores quimiotáticos, recrutando mais células inflamatórias e estimulando a angiogênese, sustentando, dessa forma, o crescimento de tumor e facilitando a metástase (Yan et al., 2006).

A IL-8/CXCL8 é uma das quimiocinas CXC pró-inflamatórias que ativam múltiplas vias quando acoplada ao receptor CXCR2, regulando de maneira importante o microambiente tumoral (Waugh e Wilson, 2008) (FIGURA 4). Sua expressão foi identificada em várias linhagens de carcinoma de células escamosas, indicando sua associação com a patogênese tumoral (Christofakis et al., 2008). Estudos vêm demonstrando uma forte ligação entre inflamação crônica e câncer oral. Diferentes marcadores, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), estão envolvidos nesse processo e se encontram diretamente relacionados com a graduação e estágio do tumor. Em função disso, muitos deles (como o VEGF e Caspase-3) podem servir como biomarcadores para monitoramento do desenvolvimento e progressão da doença (Tse et al., 2007; Christofakis et al., 2008; Margaritescu et al., 2009; Sappayatosok et al., 2009; Zhang et al., 2009).

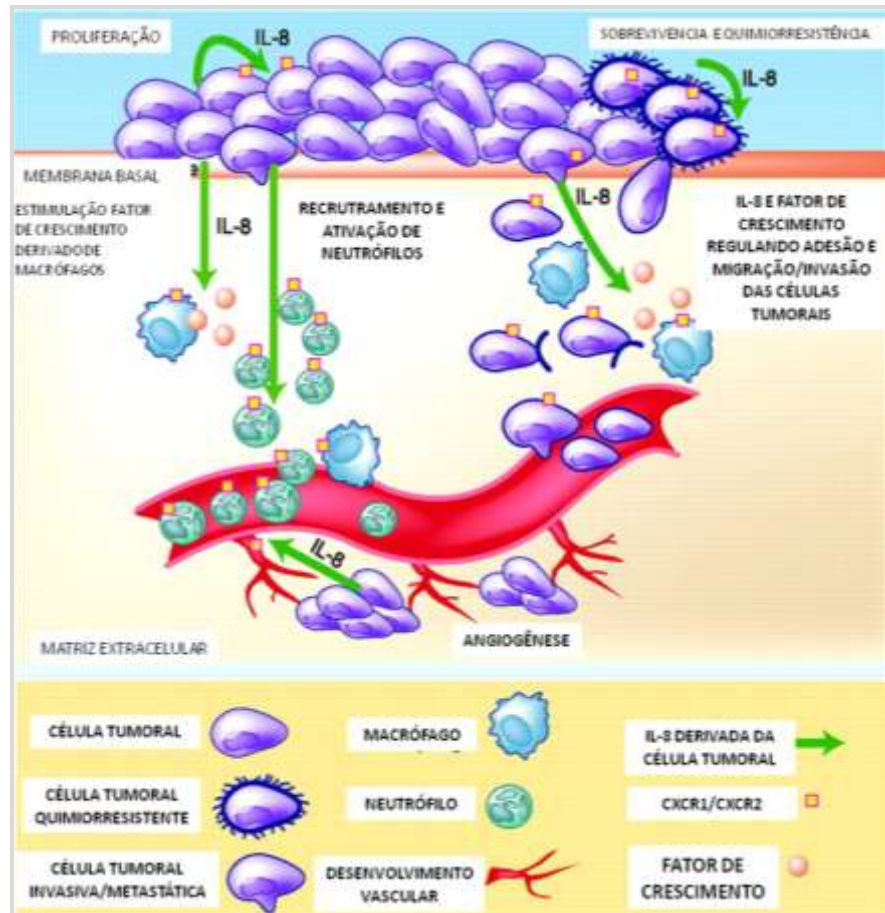


FIGURA 4. Vias de atuação da IL-8/CXCL8 no microambiente tumoral. Adaptado de Waugh e Wilson, 2008.

As quimiocinas podem apresentar múltiplos papéis no crescimento do tumor, invasão e metástase através da indução da transformação celular, angiogênese e secreção de proteases. Entretanto, os mecanismos pelos quais os receptores de quimiocinas estão implicados na transformação maligna ainda são pouco conhecidos (Arya et al., 2003; Balkwill, 2003; Le et al., 2002; Strieter et al., 2004; Slettenaar e Wilson, 2006). A quebra desse ciclo poderia determinar regimes terapêuticos eficazes no tratamento das neoplasias (Yan et al., 2006).

4 Receptores CXCR e Câncer

Evidências recentes têm indicado que as quimiocinas CXC apresentam um papel crucial nos processos de crescimento das neoplasias e angiogênese e,

portanto, na oncogênese. São capazes de influenciar a oncogênese por meio de três mecanismos: controlando a infiltração de leucócitos, atuando como fatores de crescimento e influenciando a migração celular e metástase (Rosenkilde e Schwartz, 2004; Vandercappellen et al., 2008; Waugh e Wilson, 2008; Wang et al., 2009 b). Os primeiros trabalhos descrevendo a associação dos receptores CXCR1 e CXCR2 com neoplasias surgiram nos anos 90. Na mesma época, antagonistas seletivos dos receptores CXCR, com baixo peso molecular, começaram a ser desenvolvidos (Reiland et al., 1999; Chen et al., 2004; Guha et al., 2005; Bizzarri et al., 2006).

Os receptores CXCR1 e CXCR2, específicos para quimiocinas CXC ELR⁺, foram identificados na superfície de diferentes tipos celulares e já foram clonados a partir de várias espécies, inclusive de humanos (Holmes et al., 1991; Li et al., 2001; Catusse et al., 2003a). Estes dois receptores são estruturalmente semelhantes, apresentando 77 % de homologia na sequência de aminoácidos, embora exibam diferentes características de união (Rambeaud e Pighetti, 2007). Ambos se ligam de forma semelhante à CXCL8 e CXCL6, com alta afinidade, enquanto que o CXCR2 apresenta afinidade também por outras quimiocinas CXC ELR⁺ (Lee et al., 1992). Embora esses dois receptores tenham sido caracterizados molecularmente, seus papéis biológicos ainda não foram completamente definidos. Estudos *in vitro* usando anticorpos monoclonais anti-receptor e linhagens celulares expressando CXCR1 e CXCR2 avaliaram o papel destes receptores na quimiotaxia mediada pela CXCL8 (Chuntharapai e Kim, 1995). Evidências experimentais indicaram que o CXCR1 poderia ter um papel importante na quimiotaxia de polimorfonucleares que expressassem ambos os receptores, quando mediada pela CXCL8 (Hammond et al., 1995; Chuntharapai e Kim, 1995). Por outro lado, a proliferação de queratinócitos (Devalaraja et al., 2000) e a angiogênese (Addison et al., 2000), seria mediada pela ativação do CXCR2 bem como pela super-expressão das quimiocinas CXC e seus receptores. Finalmente, alguns autores descreveram a capacidade das quimiocinas CXC em estimular a migração e a invasão das células tumorais, reforçando sua importância na progressão e metástase das neoplasias (Reiland et al., 1999; Kim et al., 2001; Li et al., 2001). É sabido que certos tumores exibem um padrão de metástase ou invasão para determinados órgãos, isto é, as células tumorais não migram aleatoriamente, mas sim, de um modo específico, que pode ser conduzido

pelo receptor de quimiocinas que o tumor expressa e que é expresso também pelo órgão-alvo (Rossi e Zlotnik, 2000; Acosta e Gil, 2009).

Trabalhos realizados com células HSC4 (carcinoma oral de células escamosas humano) revelaram uma relação entre a expressão dos receptores de IL-8/CXCL8 e a capacidade migratória e invasiva das células tumorais (Watanabe et al., 2002). Estudos com células de melanoma demonstraram que a quimiotaxia mediada pela IL-8/CXCL8 determina a migração transendotelial das células tumorais, confirmando o papel quimiotático para células neoplásicas dos receptores CXC (Ramjeesingh et al., 2003). Outros trabalhos *in vitro* também mostraram efeitos pró-angiogênicos para a IL-8/CXCL8 e para o receptor CXCR2 (Opdenakker e Van Damme, 2004; Strieter et al., 2005). Essa relação foi comprovada com a utilização de modelos experimentais de carcinoma de pulmão, empregando ratos selvagens tratados com anticorpos neutralizadores anti-CXCR2 ou ratos CXCR2^{-/-} (que apresentam deleção gênica para o receptor CXCR2), sendo observada uma redução significativa do crescimento tumor e da angiogênese (Keane et al., 2004a; Keane et al., 2004b). Em outro estudo realizado com três linhagens derivadas de neoplasia de pulmão, foi demonstrada uma alteração da expressão dos receptores CXCR1 e CXCR2, bem como da IL-8/CXCL8. Foi sugerido que a IL-8/CXCL8 poderia agir como fator de proliferação celular, tanto autócrino como parácrino, enquanto que sua função mitogênica seria mediada principalmente pelo receptor CXCR1 (Zhu et al., 2004). Igualmente, foram demonstrados papéis relevantes para os receptores CXCR1 e CXCR2 e seus ligantes em carcinoma de cólon e carcinoma renal como componentes associados à angiogênese, tumorigênese e metástase dessa neoplasia (Mestas et al., 2005). Ambos os receptores também foram associados à iniciação e à progressão do câncer de próstata, através de seus efeitos sobre a proliferação celular e sobre a angiogênese (Li et al., 2004; Murphy et al., 2005). Da mesma forma, foi demonstrada a participação do microambiente tumoral na atividade do receptor CXCR2 contribuindo para a expansão de neoplasias pulmonares induzidas pelo oncogene *KRAS* (Wislez et al., 2006).

De forma interessante, um trabalho conduzido por Wang et al. (2006) demonstrou um aumento da expressão das quimiocinas CXCL1/GRO- α e CXCL2/GRO- β e dos receptores CXCR2 em tecidos de tumor de esôfago, em comparação com tecidos normais adjacentes. Além disso, os mesmos autores,

utilizando a linhagem de células de câncer de esôfago WHCO1, mostraram que a incubação *in vitro* do antagonista seletivo dos receptores CXCR2, o SB225002, causou uma redução de aproximadamente 40 % da proliferação celular. Ademais, este mesmo antagonista, bem como o anticorpo específico anti-GRO β , foram capazes de inibir a ativação de vias de sinalização intracelular, envolvidas no desenvolvimento tumoral (Wang et al., 2006).

As diversas evidências experimentais sugestivas do envolvimento das quimiocinas CXC, bem como de seus receptores nos processos de oncogênese estimularam outros estudos a fim de identificar antagonistas dos receptores de quimiocinas como possíveis alternativas para a terapia do câncer (Hidaka et al., 2002). Assim, estudos pré-clínicos utilizando modelos animais de tumor confirmaram a idéia de que antagonistas dos receptores CXC poderiam representar novas opções terapêuticas para alguns tipos de câncer (Balkwill, 2003). Neste contexto, é possível inferir que o bloqueio destas quimiocinas seria capaz de inibir a invasão e metástase tumorais (Opdenakker e Van Damme, 2004; Strieter et al., 2006; Yan et al., 2006), representando assim, uma estratégia terapêutica válida para o tratamento de diversas neoplasias (Bizzarri et al., 2006). Vários autores têm sugerido que antagonistas destes receptores poderiam fornecer respostas clínicas bastante satisfatórias especialmente em combinação com a quimioterapia antitumoral convencional (Keane et al., 2004a; Rollins, 2006; Acosta e Gil, 2009) e também em doenças auto-imunes e outros processos inflamatórios (Horuk, 2009).

5 Antagonista SB225002

A identificação estrutural das quimiocinas e dos domínios envolvidos na ligação e ativação de seus receptores permitiu grandes avanços na compreensão dos papéis biológicos desta família de mediadores. Uma vez que vários estudos sugerem o envolvimento das quimiocinas em diferentes doenças, anticorpos neutralizadores, antagonistas peptídicos e não-peptídicos e agentes imunossupressores vêm sendo investigados como novas alternativas terapêuticas, por meio do bloqueio de um ou mais receptores de quimiocinas (Howard et al., 1999; Baggiolini, 2001; Onuffer e Horuk, 2002).

Em meados da década de 1990, foram iniciados alguns estudos a fim de identificar antagonistas potentes e seletivos dos receptores CXCR2, principalmente

para o desenvolvimento de antagonistas de natureza não-peptídica. Estes antagonistas, diferentemente de outros estudados, têm a vantagem de não induzir respostas imunes neutralizadoras, além de haver uma redução nos problemas de biodisponibilidade e toxicidade, podendo ser utilizados por via oral (White et al., 1998; Howard et al., 1999; Matzer et al., 2004).

A molécula SB225002 (FIGURA 5) representa o primeiro antagonista seletivo e não-peptídico dos receptores CXCR2, que foi desenvolvido em 1998 por White et al. O desenvolvimento deste antagonista teve como base o conhecimento de que algumas quimiocinas participavam ativamente como mediadoras de inflamação, pela sua ligação com receptores CXCR1 e CXCR2, enquanto outras só se uniam aos receptores CXCR2 (seletivamente). A molécula SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea) foi caracterizada por meio de ensaios de união específica em células transfectadas com o receptor CXCR2. Nestes experimentos, o SB225002 foi capaz de inibir a ligação da IL-8/CXCL8 ao receptor CXCR2 com CI_{50} de 22 nM, o que indica que o mesmo é bastante potente. Em protocolos experimentais *in vitro*, a incubação do SB225002 produziu inibição da quimiotaxia para neutrófilos humanos e de coelho, induzida tanto por IL-8/CXCL8 como por GRO- α /CXCL1. Os resultados obtidos *in vitro*, foram confirmados por estudos *in vivo*, sendo que o SB225002 inibiu seletivamente a marginação de neutrófilos induzida por IL-8/CXCL8 em coelhos. A utilização do SB 225002 auxiliou a definir o papel do CXCR2 em doenças inflamatórias, onde os neutrófilos parecem exercer funções fundamentais (White et al., 1998).

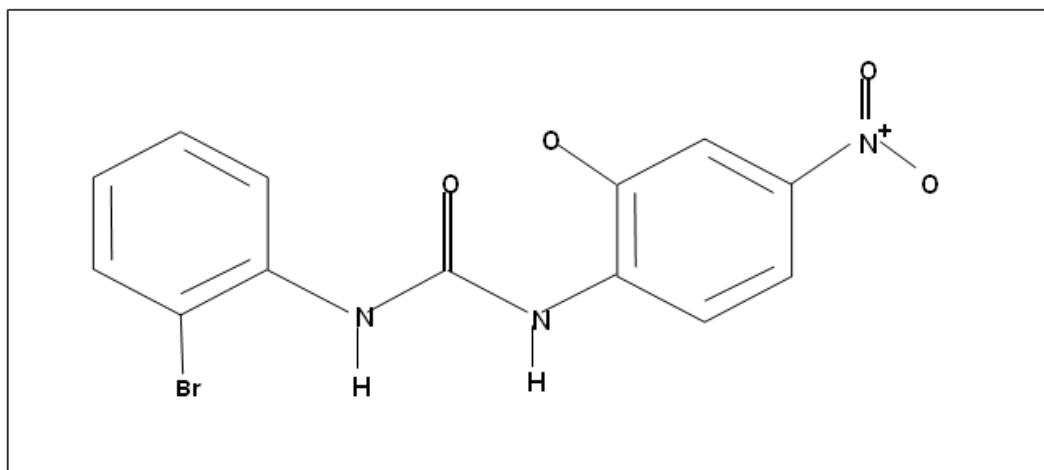


FIGURA 5. Estrutura química do SB225002 (White et al., 1998).

Estudos adicionais foram realizados a fim de determinar o sítio específico de interação do SB225002 com o receptor CXCR2, bem como para determinar a seletividade de ligação deste antagonista (Catusse et al., 2003b). Além disso, efeitos benéficos foram observados para o SB225002 no processo de cicatrização (Rosenkilde e Schwartz, 2004). Estudos mais recentes mostraram ainda que o SB225002 inibe, de maneira dose-dependente, a marginação de neutrófilos causada pela IL-8/CXCL8 em coelhos (Bizzarri et al., 2006) e que o seu uso sistêmico é capaz de reduzir as respostas álgicas em diferentes modelos de nocicepção em camundongos (Manjavachi et al., 2009). Finalmente, como mencionado acima, o antagonista do SB225002 diminuiu a proliferação de células de câncer de esôfago em cultura, sugerindo que o bloqueio dos receptores CXCR2 poderia representar uma estratégia potencial para o tratamento do câncer (Wang et al., 2006; Wang et al., 2009 b).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o envolvimento dos receptores CXCR2 para quimiocinas no carcinoma espinocelular da cavidade oral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Avaliar o efeito da incubação de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB 225002, sobre a viabilidade de células de carcinoma das linhagens SCC158 (carcinoma escamoso derivado do meato acústico externo de rato Fischer 344), HN30 (carcinoma de células escamosas oral humano) e HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados normais).

2 Avaliar o efeito da incubação com os agonistas do receptor CXCR2, IL-8/CXCL8 e CINC-1, sobre a proliferação de células HN30 e SCC158, respectivamente.

3 Estabelecer um modelo animal de carcinoma espinocelular de língua induzido pela inoculação células da linhagem SCC158 em ratos Fischer 344, caracterizando-o a partir de seus aspectos clínicos e histopatológicos.

4 Avaliar o perfil temporal da imunomarcagem dos receptores CXCR2 no modelo animal de carcinoma espinocelular de língua induzido pela inoculação células da linhagem SCC158 em ratos Fischer 344.

5 Identificar a presença de VEGF e Caspase-3, marcadores de angiogênese e apoptose, respectivamente, relacionando-a com a marcação temporal dos receptores CXCR2.

MATERIAL E MÉTODOS

LINHAGENS CELULARES

Para a realização deste trabalho foram empregadas as seguintes linhagens celulares (FIGURA 6):

SCC158 – Carcinoma de células escamosas derivado do meato acústico externo de ratos Fischer 344 – fornecidas pelo Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB, Tóquio, Japão);

HN30 - Carcinoma oral de células escamosas humano;

HaCaT - queratinócitos humanos normais.

Estas duas últimas linhagens de células imortalizadas, pertencentes ao laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.

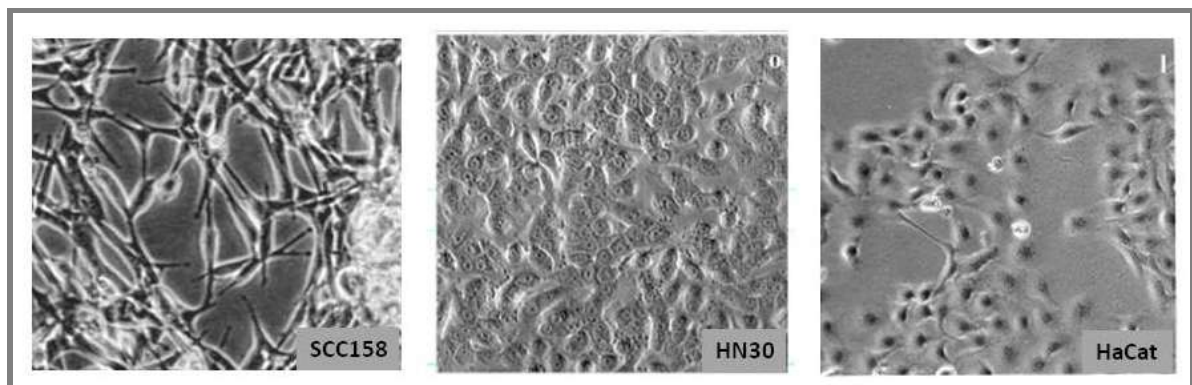


FIGURA 6. Linhagens celulares: **SCC158** – carcinoma de células escamosas derivado do meato acústico externo de ratos Fischer 344; **HN30** – Carcinoma oral de células escamosas humano; **HaCaT** - queratinócitos humanos.

ESTUDOS *IN VITRO*

Esta série de experimentos foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada I, sala 149, Prédio 12C, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

1 Cultura de células

Todos os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, sendo respeitados os protocolos de esterilização dos materiais e suplementos utilizados.

As células foram cultivadas em frascos de 25 e 75 cm³, contendo, respectivamente, 5 e 15 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GIBCO[®], USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - GIBCO[®], USA), 2,5 mg/ml Fungizona[®] e 100 U/l gentamicina e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂ (FIGURA 9). O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado a cada 48h. Ao ocuparem 70% do frasco (subconfluência), as células foram subcultivadas pela incubação com solução de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO[®],USA). Frações dessas culturas foram congeladas para manter os estoques das linhagens. Este mesmo protocolo foi realizado para a execução dos experimentos.

Para os experimentos *in vitro*, as células foram contadas e transferidas para placas de cultura com vinte e quatro ou noventa e seis poços (Patel et al., 1998; Yigitbasi et al., 2004; Bernardi et al., 2006; Morrone et al., 2006) (FIGURAS 7, 8 e 9).



FIGURA 7. Preparo da Câmara de Neubauer (hemocitômetro-A) e posicionamento ao microscópio óptico para a contagem das células (B).

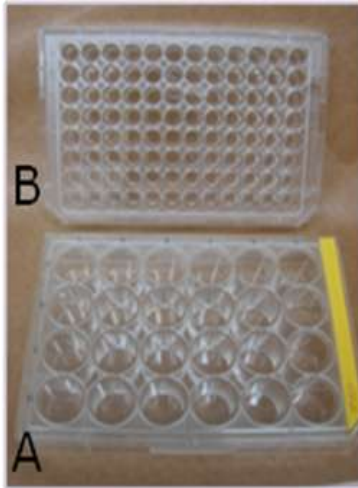


FIGURA 8. Placas de cultura com (A) 24 e (B) 96 poços.



FIGURA 9. Frascos de 75 (A) e 25 (B) cm³; e placas de cultura (C) mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂.

2 Protocolos de incubação com o SB225002

Os efeitos da incubação do antagonista seletivo dos receptores CXCR2, o SB225002, foram avaliados sobre a viabilidade das células das linhagens SCC158, HN30 e HaCaT. O SB225002 foi sintetizado no Laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelos Drs. Ricardo José Nunes e Paulo César Leal, de acordo com a metodologia descrita por White et al. (1998) e doado para este estudo.

As células foram transferidas para placas de cultura com noventa e seis poços, em uma densidade de 1×10^4 células/poço e, posteriormente, incubadas com concentrações de SB225002 a 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 nM. No grupo controle, foi utilizado o veículo (DMSO 0,01%). Antes da adição de qualquer droga, as células foram lavadas uma vez com PBS e novamente mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os experimentos foram repetidos e sempre realizados em triplicata. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂, durante os tempos de 24, 48 72h.

As concentrações do antagonista foram selecionadas com base em estudos anteriores (Wang et al., 2006).

3 Protocolos de incubação com o IL-8 e CINC-1

Os efeitos da incubação dos agonistas dos receptores CXCR2, IL-8/Interleukin-8 (Human, rDNA-derived - NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control, UK) e CINC-1/Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (Rat, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foram avaliados sobre viabilidade das células das linhagens HN30 e SCC158, respectivamente.

As células foram cultivadas em placas de cultura com noventa e seis poços, em uma densidade de 1×10^3 células/poço e submetidas à redução gradativa da concentração de SBF no meio, de 10 % para 0,5 % (déficit nutricional - *starving*). Antes da adição de qualquer droga, as células foram lavadas uma vez com PBS e novamente mantidas em DMEM suplementado com 0,5% de soro bovino fetal. As células foram incubadas a 37° C, durante 24 h após o tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a avaliação do efeito da IL-8 humana sobre a linhagem HN30 foram usadas as concentrações de 1, 10, 30 e 100 ng/ml. Para avaliar os efeitos da CINC-1 sobre a linhagem SCC158, foram utilizadas as concentrações de 1, 10 e 100 nM (Shibata et al., 2000; Suzuki et al., 2000). Nos dois grupos experimentais, foi empregado PBS como controle.

4 Ensaio de viabilidade celular

Após cada protocolo de tratamento, com as diferentes concentrações de SB225002, IL-8 ou CINC-1, com o objetivo de verificar a viabilidade das células, foi realizado o ensaio de MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio]. O princípio deste método reside no fato de que o MTT é capaz de entrar na célula e ser oxidado a MTT-formazan pelo superóxido produzido durante a atividade mitocondrial. Desta forma, a oxidação do MTT em seu produto MTT-formazan (formazan azul escuro) é proporcional à atividade mitocondrial e, por conseguinte, à viabilidade celular. Decorridos os tempos previstos após a adição do SB225002, IL-8 e CINC-1, o meio de cultura presente nos poços foi desprezado e substituído por 100 µl de DMEM novo contendo 10% v/v de uma solução de MTT 5 mg/ml (PBS). A seguir, as células foram incubadas por 3 h em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi novamente desprezado e os poços preenchidos com 100 µl de solução de DMSO e a absorbância quantificada em leitor de placas de 96 poços (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc), em 595 nm (FIGURA 10). A viabilidade

celular foi calculada considerando-se a absorbância do grupo-controle (DMSO 0,01 %) como 100% (Yigitibasi et al., 2004).

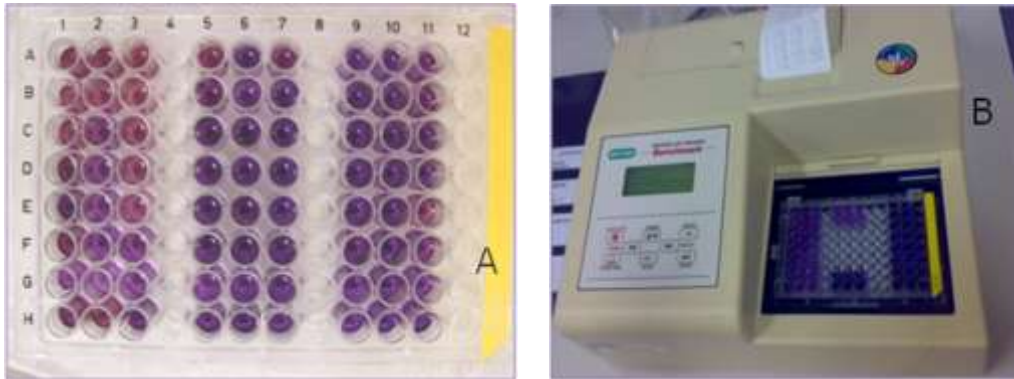


FIGURA 10. Aspecto da placa após a técnica do MTT (A), imediatamente antes da quantificação em leitor de placas de 96 poços, em 595 nm (B).

ESTUDOS *IN VIVO*

Esta série de experimentos foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada I, sala 148C e os animais mantidos na Sala 108, localizada no Bloco E, Prédio 12, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

As células da linhagem SCC158 foram cultivadas e mantidas conforme os protocolos descritos anteriormente nos estudos *in vitro*.

1 Animais

No presente estudo, foram utilizados ratos Fischer 344, fêmeos e machos, imunocompetentes, pesando 180 – 250 g (N= 3 por grupo) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, equipadas com filtros de entrada e saída de ar (Alesco, Monte Mor-SP- Brasil), com temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}$ C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7h luzes apagadas às 19h). Dentro das estantes, os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus (troca três vezes por semana), em número máximo de 5 animais por gaiola. Os animais receberam ração peletizada (Nuvilab, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo-PR-Brasil) e água filtrada (filtro Jojaco, Capivari de Baixo-SC-Brasil) *ad libitum*. Nenhum procedimento experimental foi realizado no

espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1 h, no qual os animais continuaram com livre acesso à água e à ração. Todos os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h.

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes, do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos da América, que são adotadas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram submetidos à apreciação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia (Protocolo 0007/07) e do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (protocolo 07/03752).

Para a realização dos procedimentos, os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal da associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg peso). A eutanásia foi realizada por inalação de isoflurano, nos intervalos de tempo apropriados. Depois da eutanásia, os animais foram considerados como lixo biológico e recolhidos semanalmente pelo setor de descarte da PUCRS.

2 Caracterização do modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua de rato

O protocolo de indução tumoral foi adaptado a partir da metodologia descrita originalmente por Hasegawa et al. (1998) e Nagamine et al. (2006).

Após o cultivo, as células da linhagem SCC158, foram contadas, centrifugadas e ressuspensas na densidade de 5×10^6 células/0,05 mL de PBS. Cada rato recebeu uma injeção submucosa, diretamente na região lateral esquerda da língua, utilizando uma seringa de insulina de 0,5 ml (B&D, USA) (FIGURA 11). Foram determinados os tempos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias para a observação do desenvolvimento do tumor. Os tempos de eutanásia foram definidos com base na progressão tumoral e em estudos da literatura (Myers et al., 2002; Nagamine et al., 2006).



FIGURA 11. Sequência do protocolo de injeção de 5×10^6 células da linhagem SCC158 na borda da língua, lado esquerdo, do rato Fischer 344.

3 Análise histopatológica

O preparo das lâminas para a análise histopatológica foi realizado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS. A identificação das mesmas seguiu a numeração conforme o livro de registros do laboratório.

Os espécimes foram coletados imediatamente após a eutanásia, fixados em formalina 10% e posteriormente parafinados. A peça foi seccionada transversalmente, obtendo-se um plano de corte na área de maior diâmetro da lesão (FIGURA 12). Foram obtidos cortes com espessura de 5 μm e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

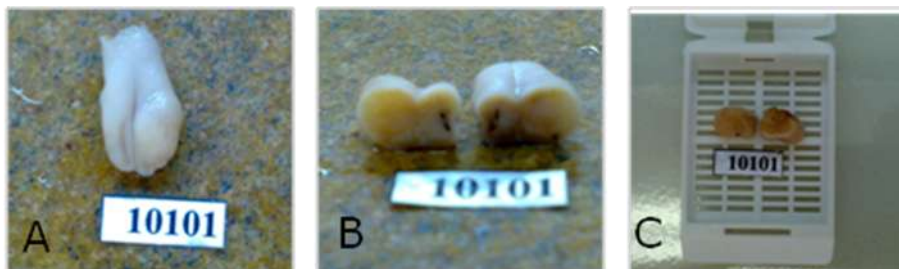


FIGURA 12. Preparo da peça para a histotécnica: (A) aspecto macroscópico, (B) plano de corte (C) posição de inclusão.

A avaliação histopatológica foi feita por um dos autores sob supervisão de patologista considerado *Gold Standard*, referência em caso de dúvida no diagnóstico. Foi considerada a presença ou ausência de neoplasia e, ainda, os critérios de malignidade propostos por Anneroth et al. (1986) e adaptados ao modelo desenvolvido (QUADRO 4), com a possibilidade de descrever qualitativamente a neoplasia nos diferentes tempos do estudo. Para a obtenção das fotomicrografias foi utilizado microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon Inc., NY, USA) e câmera digital (DS-

5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados. Ademais, foi avaliado o tamanho do tumor, no que se refere à sua maior extensão no corte transversal, em relação à língua. As imagens, nesse caso, foram obtidas através de lupa estereoscópica (Lupa Zeiss Stemi DV4, Germany) e câmera digital (G9, Canon Inc., NY, USA) acoplados (FIGURA 13).

As imagens digitais, em ambos os casos, foram transferidas para um computador e a análise quantitativa do tamanho da lesão foi realizada através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, USA).

QUADRO 4. Critérios de malignidade do carcinoma espinocelular adaptado de Anneroth et al., 1986 ao modelo experimental desenvolvido.

CRITÉRIO	PARÂMETRO MORFOLÓGICO
População Celular	Diferenciação/Ceratinização Pleomorfismo celular/nuclear Mitoses
Relação Tumor-Hospedeiro	Modo de invasão//limites Estágio da Invasão Resposta inflamatória



FIGURA 13. Exemplo de corte histológico da língua, coloração HE, apresentando tumor com sete dias desenvolvimento, indicando as regiões da análise microscópica descritiva (1) e também os pontos usados como referência nas tomadas de medida da língua (A) e do tumor (B).

4 Análise imunoistoquímica

Para as análises imunoistoquímica foi utilizada a metodologia descrita previamente por Medeiros et al. (2007). Para identificar o receptor CXCR2, a imunodeteção foi realizada utilizando o anticorpo gerado em camundongo, anti-CXCR2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Foram ainda avaliadas as expressões da caspase-3 (anticorpo gerado em coelho, anti-caspase-3; Cellsignal, Boston, MA, EUA) e VEGF (anticorpo gerado em camundongo, anti-VEGF, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), marcadores de apoptose e angiogênese, respectivamente.

Cortes teciduais com espessura de 3 μm foram montados sobre lâminas silanizadas sendo mantidas em estufa (50 °C) durante 1 h para fixação dos cortes. Após a fixação, os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, 80 % e 70 %). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % e metanol absoluto (v/v), por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi utilizada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min em temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, as mesmas foram submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada utilizando os anticorpos anti-CXCR2 (diluição 1:50), anti-caspase-3 (diluição 1:50) e anti-VEGF (diluição 1:200). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida (2 – 8 °C), durante 12 – 16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS em temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (Streptavidina-Biotina-Peroxidase - Dako

Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em câmara úmida, durante 1 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5 min, em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com solução cromógena composta por 60 mg de DAB (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) dissolvido em 2 mL de DMSO e diluído em 100 mL de peróxido de hidrogênio por 5 minutos. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil).

Os resultados foram obtidos por meio de microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados. As imagens digitais foram transferidas para um computador e a intensidade de marcação foi determinada através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média. As porcentagens de inibição são apresentadas como a média \pm erro padrão da média das inibições obtidas para cada experimento individual.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 ($*p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os gráficos foram confeccionados utilizando o software GraphPad Prism[®] 4.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

ESTUDOS *IN VITRO*

O resultado da avaliação do efeito da incubação de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB 225002, sobre a viabilidade de células das linhagens SCC158, HN30 e HaCaT está apresentado sob a forma de gráficos.

Observa-se que a incubação com o antagonista seletivo SB225002, nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 800 nM, para o receptor CXCR2, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h reduz de maneira concentração e tempo-dependente a viabilidade das células da linhagem SCC158 de rato, como demonstrado pelo ensaio de MTT. A inibição máxima foi observada na concentração de 400 nM, em todos os tempos avaliados (FIGURA 14 e TABELA 1).

Para confirmar os resultados obtidos com células de rato, foram testados os efeitos do SB225002 nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 nM sobre a viabilidade da linhagem HN30 de carcinoma humano. Os dados obtidos demonstram uma inibição que foi proporcional ao tempo de incubação e à concentração utilizada, sendo máxima na concentração de 800 nM, no tempo de 72 h (FIGURA 15 e TABELA 1).

A fim de avaliar a seletividade do SB225002 sobre células tumorais, o mesmo protocolo de tratamento *in vitro* com este antagonista foi avaliado sobre uma linhagem de queratinócitos humanos normais, HaCaT. Os resultados do ensaio de MTT demonstram que, embora tenha sido observada uma discreta redução da viabilidade celular em algumas concentrações e tempos testados, estes efeitos não foram estatisticamente significativos (FIGURA 16).

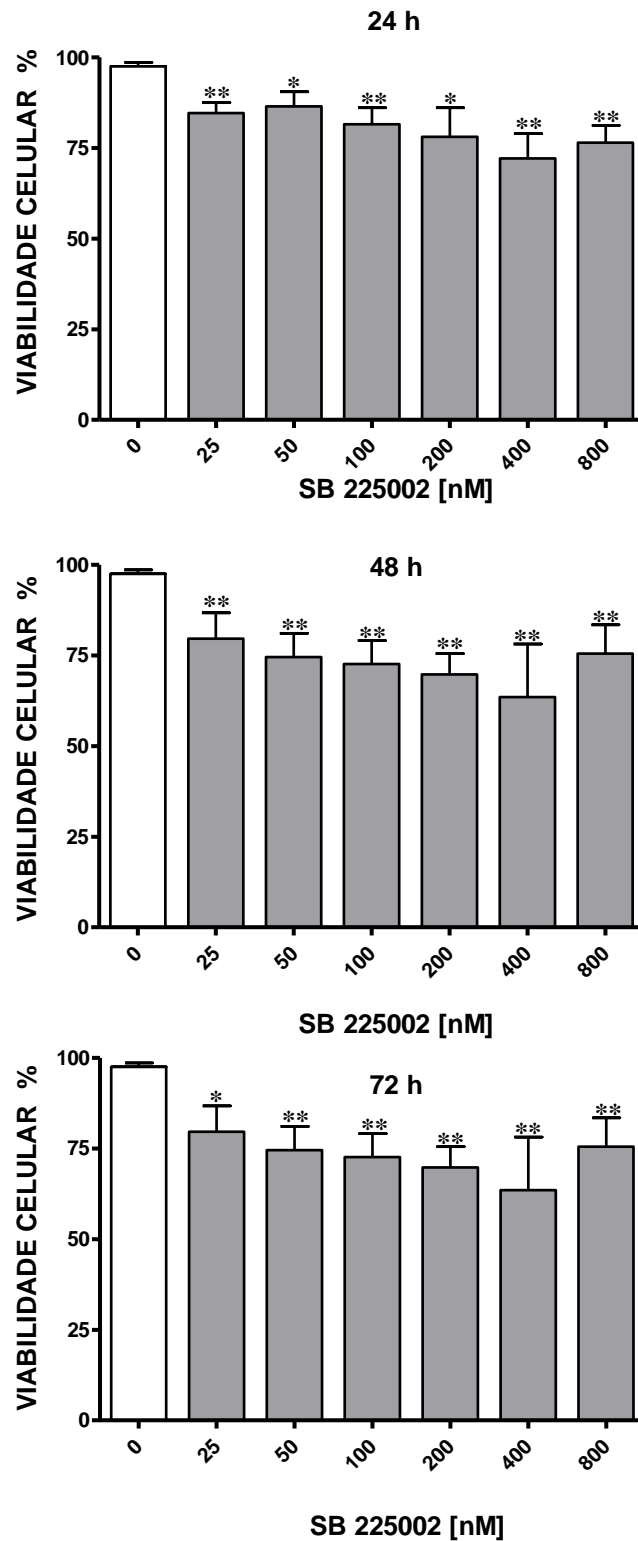


FIGURA 14. Efeito da incubação *in vitro* com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da linhagem celular SCC158, oriunda de carcinoma de células escamosas de rato Fischer 344, nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Como grupo controle foi utilizado DMSO 0,01% [0]. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

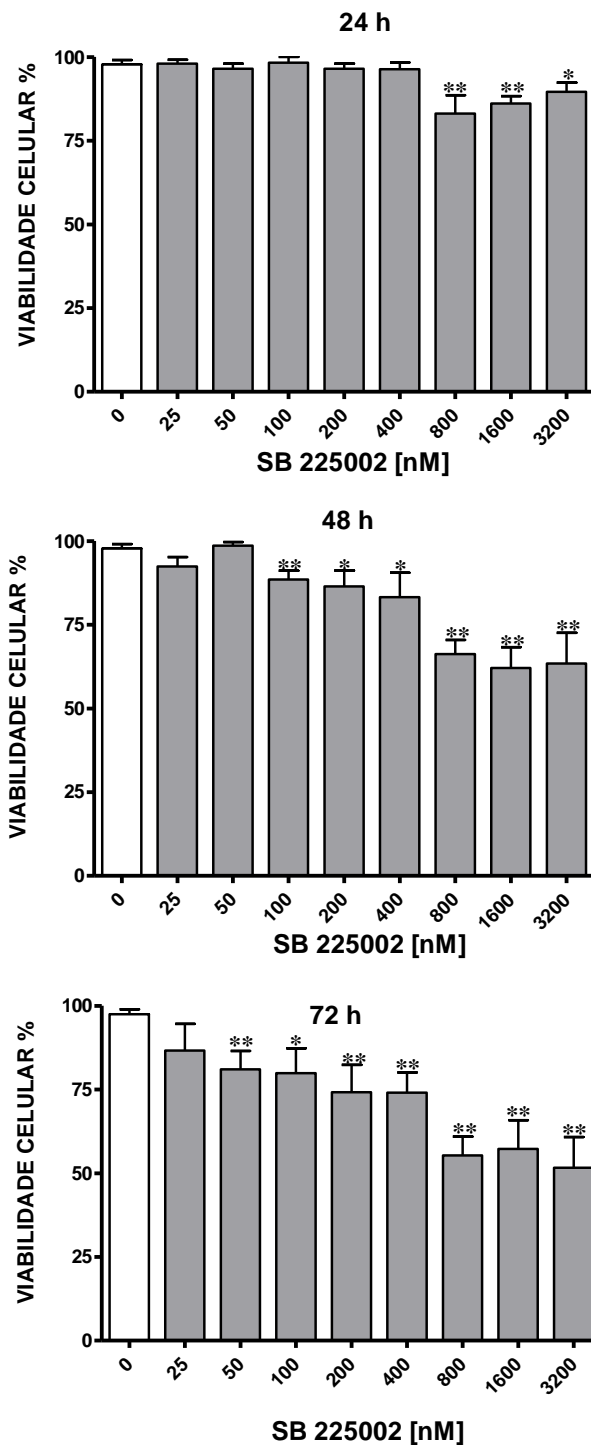


FIGURA 15. Efeito da incubação *in vitro* com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da linhagem celular HN30, oriunda de carcinoma de células escamosas humano, nos tempos de 24h, 48h e 72h. Como grupo controle foi utilizado DMSO 0,01% [0]. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

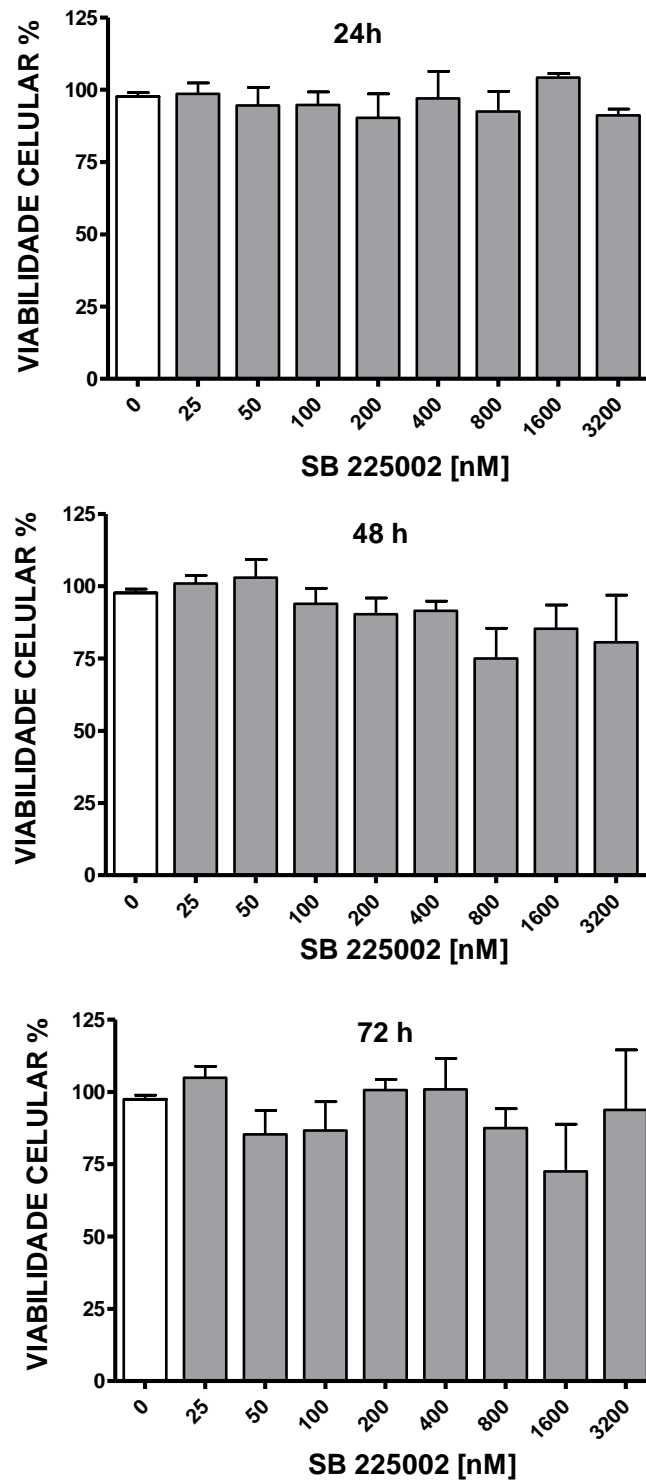


FIGURA 16. Efeito da incubação *in vitro* com o antagonista seletivo SB225002 para o receptor CXCR2 sobre a viabilidade da linhagem celular HaCaT, queratinócitos humanos imortalizados, nos tempos de 24h, 48h e 72h. Como grupo controle foi utilizado DMSO 0,01% [0]. Cada coluna representa a média de três experimentos, realizados em triplicata. As linhas indicam o erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

TABELA 1. Percentagens de inibição para o SB225002 sobre a viabilidade celular, através do ensaio de MTT, nas linhagens SCC158 e HN30, de carcinoma de células escamosas de rato e humanos, respectivamente.

SB225002 [nM]	% Inibição (média ± e.p.m.)					
	Linhagem SCC158			Linhagem HN30		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	-	-	-	-	-	-
25	13±3**	18±7**	20±7*	NS	NS	11±8**
50	11±4*	23±7**	31±10**	NS	NS	17±5*
100	16±5**	25±7**	26±8**	NS	9±3**	18±8**
200	20±8*	28±6**	28±6**	NS	11±5*	24±8**
400	26±7**	35±15**	24±6**	NS	15±7*	24±6**
800	22±5**	23±8**	29±9*	15±6*	32±4**	43±6**
1600	-	-	-	12±2**	37±6**	41±9**
3200	-	-	-	8±3*	35±9**	53±9**

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

NS: Não significativo

Para confirmar a presença do receptor CXCR2 nas células de carcinoma oral, oriundas tanto de humanos como de ratos, foi avaliado o efeito da incubação com os agonistas seletivos, IL-8 e CINC-1, sobre a proliferação de células HN30 e SCC158, respectivamente.

Os resultados, na FIGURA 17, demonstram um aumento concentração-dependente da proliferação celular quando as células HN30 foram incubadas com IL-8 nas concentrações de 1, 10, 30, 100 ng/ml. Dessa forma, ficou caracterizada a presença do receptor CXCR2 e, principalmente, a sua participação no aumento da população celular. O maior aumento foi observado na concentração de 30 ng/ml, de aproximadamente 60 vezes, quando comparado ao controle.

O mesmo comportamento foi observado após a incubação das células SCC158 com o agonista CINC-1, nas concentrações de 1, 10, 100 nM. O aumento máximo (cerca de 20 vezes) foi observado com a concentração de 10 nM (FIGURA 18).

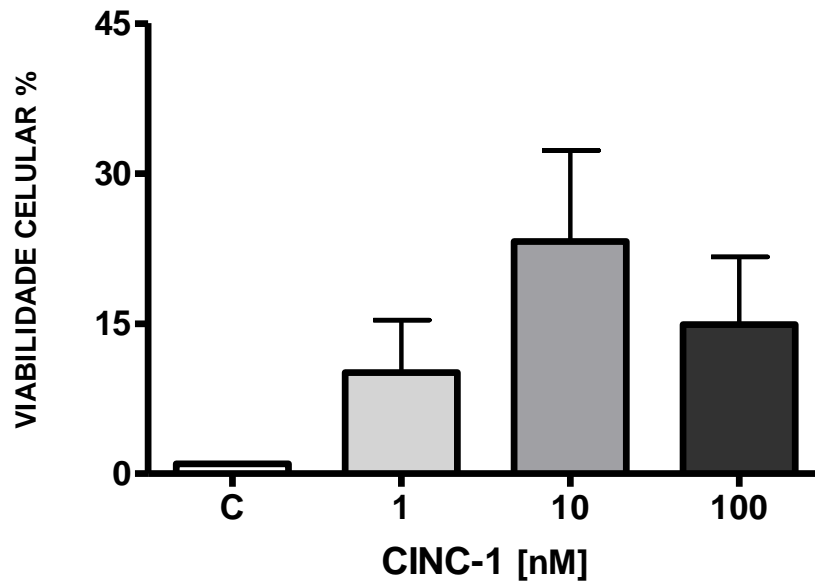


FIGURA 17. Efeito da incubação *in vitro* com o agonista CINC-1 para o receptor CXCR2 sobre a proliferação da linhagem celular SCC158, oriunda de carcinoma de células escamosas de rato, em 24h. C = controle PBS. Cada coluna representa a média de um experimento realizado em triplicata.

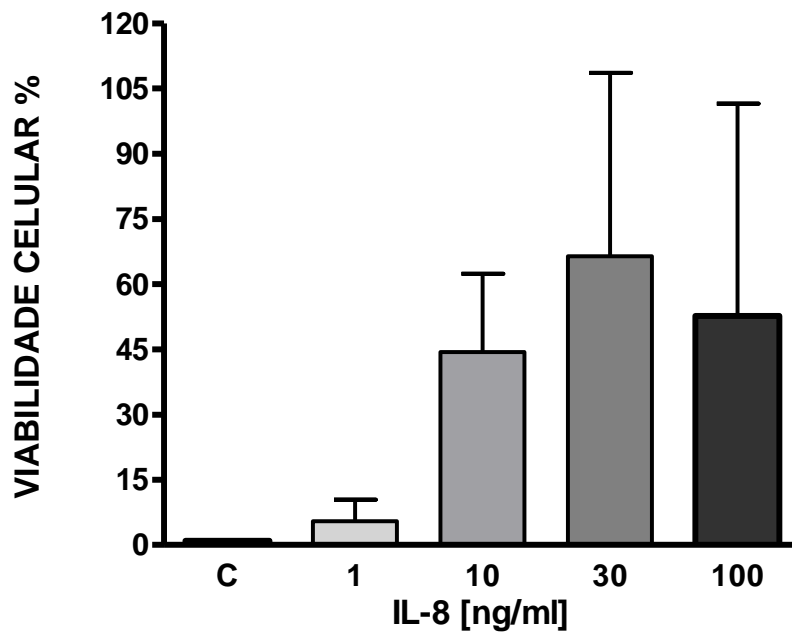


FIGURA 18. Efeito da incubação *in vitro* com o agonista IL-8 para o receptor CXCR2 sobre a proliferação da linhagem celular HN30, oriunda de carcinoma de células escamosas humano, em 24h. C = controle PBS. Cada coluna representa a média de dois experimentos realizados em triplicata.

ESTUDOS *IN VIVO*

Nesta série de experimentos foi realizada a caracterização de um modelo de carcinoma espinocelular de língua induzido pela inoculação de células da linhagem SCC158 em ratos Fischer 344. A FIGURA 19 mostra o aspecto clínico e a evolução da lesão nos diferentes tempos do experimento, a partir da imagem da língua de um dos ratos sem tumor. De maneira interessante, a lesão teve início como um aumento de volume localizado (7, 14 e 21 dias), com o desenvolvimento gradativo de características clínicas que lembram as características típicas das lesões de carcinoma espinocelular em humanos: úlcera de bordos elevados e endurecidos, com necrose na porção central (28 e 40 dias). A análise clínica também revelou a presença de aumento da vascularização na periferia do tumor, no tempo de 40 dias (FIGURA 20).

A observação clínica identificou um aumento de volume correspondente à cerca de duas a três vezes o volume normal da língua em alguns animais, gerando desconforto e limitando a alimentação, no tempo de 40 dias. Em função disso, este foi o tempo máximo de observação, quando os animais foram então submetidos à eutanásia conforme o protocolo.

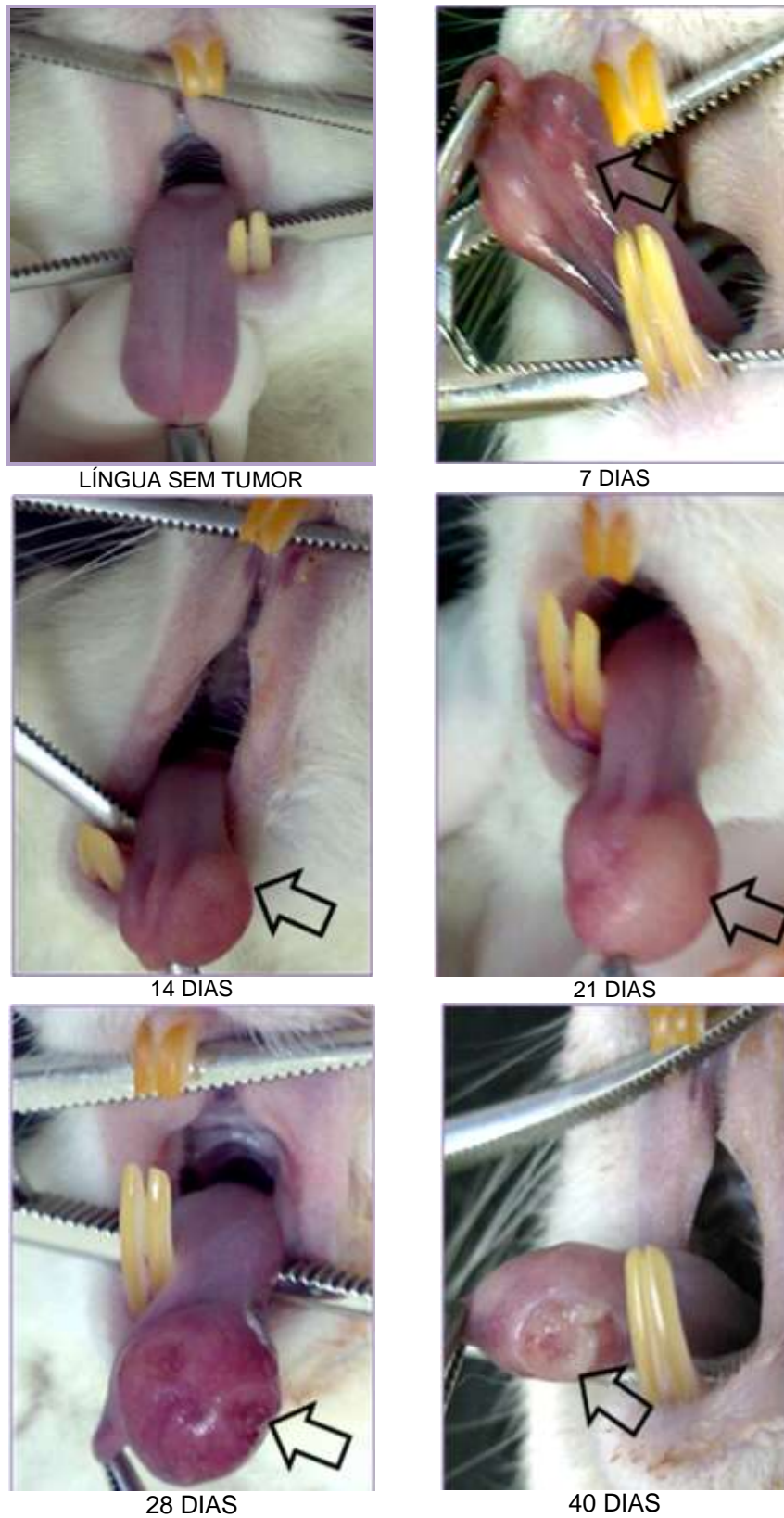


FIGURA 19. Evolução clínica do modelo experimental de carcinoma de células escamosas em língua de ratos Fischer 344, após 7, 14, 21, 28, 40 dias da indução do tumor (⇒) pela injeção submucosa de 5×10^6 células por sítio, em $50 \mu\text{L}$ de PBS, na região lateral esquerda da língua.

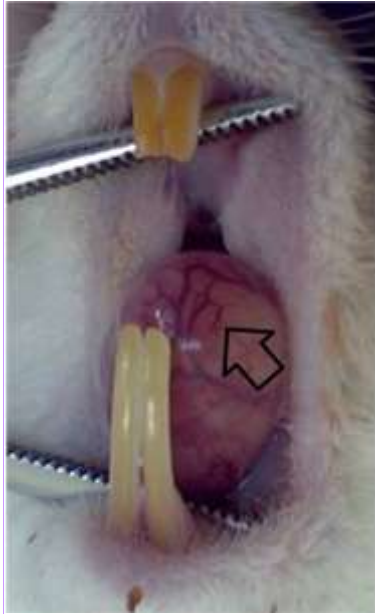


FIGURA 20. Aumento da vascularização (⇔) na periferia do tumor em língua de ratos Fischer 344, 40 dias após a indução do tumor na região lateral esquerda da língua.

No que diz respeito ao aspecto microscópico, observa-se o desenvolvimento do tumor de modo localizado e gradativo. À medida que aumenta o tempo experimental, nota-se a presença de áreas de degeneração (**D**), necrose (**N**) e ulceração superficial (**U**) (FIGURA 21). O gráfico apresenta, em valores percentuais, a extensão do tumor em relação ao tamanho da língua, no corte transversal, nos diferentes períodos de estudo (FIGURA 22).

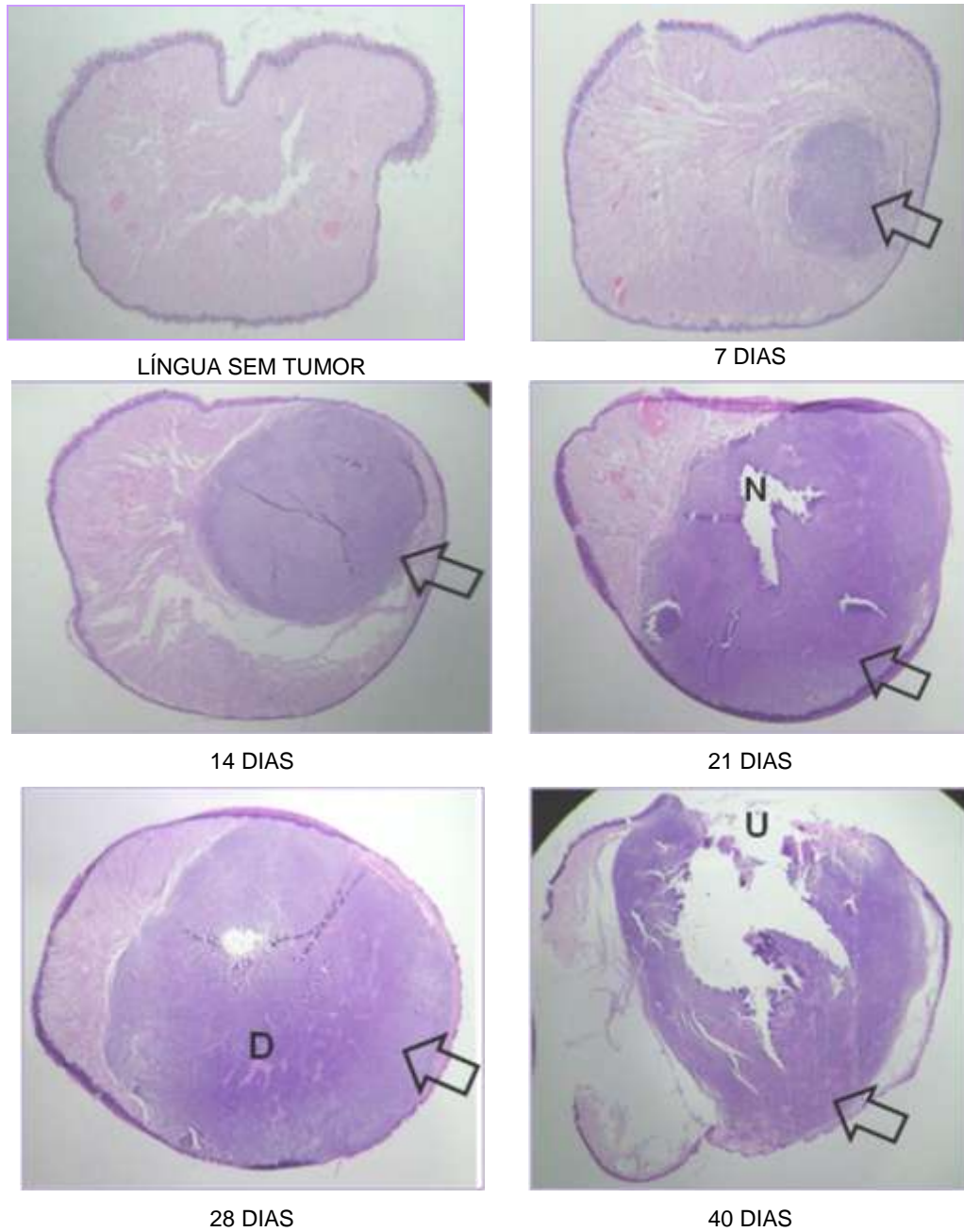


FIGURA 21. Aspecto microscópico do modelo experimental de carcinoma oral de células escamosas (⇒), conforme o período estudado. Áreas de degeneração (D), necrose (N), ulceração superficial (U). Fotomicrografia obtida em microscópio estereoscópico, aumento de 8X. Coloração HE.

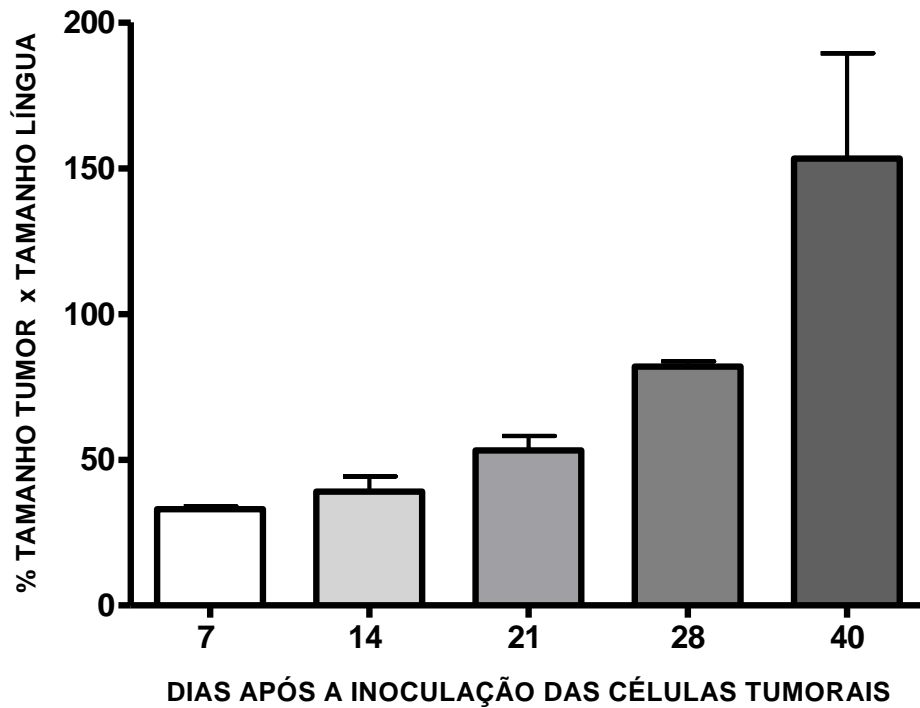
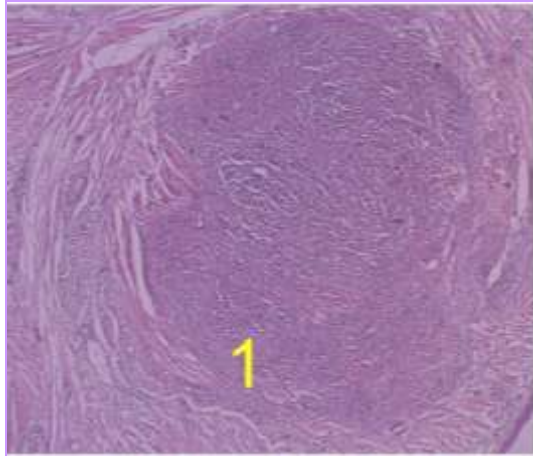


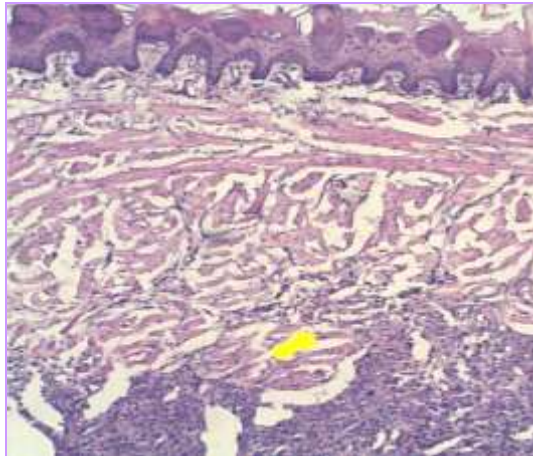
FIGURA 22. Tamanho do tumor do modelo experimental de carcinoma de células escamosas em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias. A medida foi obtida em sua maior extensão em relação ao tamanho da língua, no corte transversal. Cada coluna representa a média de três medidas em cada tempo de experimento. Os resultados são expressos em porcentagem.

Na observação ao microscópio óptico, dos cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE) nos aumentos de 40, 100 e 400X, podem ser identificados os critérios de malignidade, adaptados para este estudo, no que se refere à relação tumor-hospedeiro e à população celular (FIGURAS 23A a 23F).

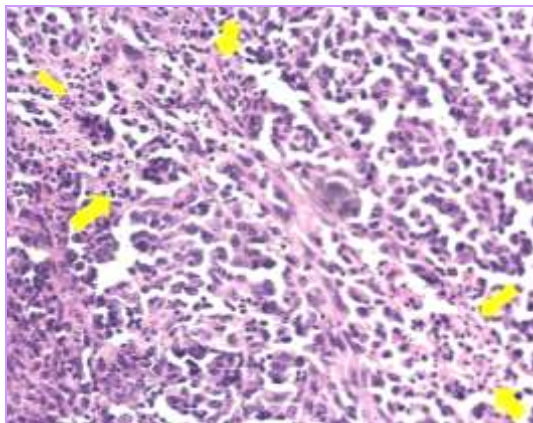
FIGURAS 23A a 23F. Fotomicrografias apresentando as características de malignidade, segundo os critérios adaptados para este estudo, nas lesões desenvolvidas pelos ratos Fischer 344 após a indução tumoral.



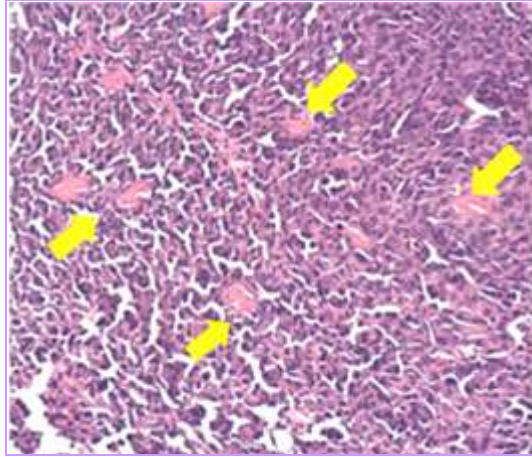
23A) Aspecto geral da relação tumor-hospedeiro, mostrando o tumor com 7 dias de evolução (1). 40X HE.



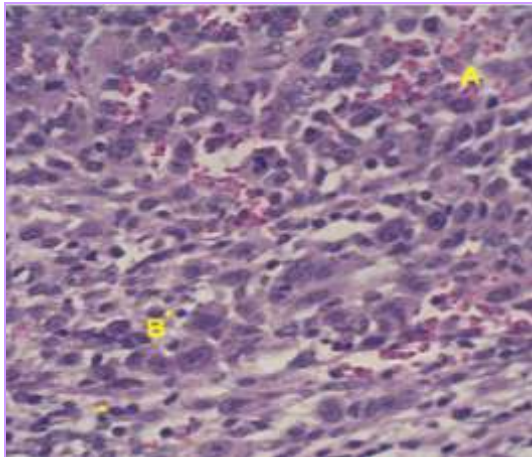
23B) Relação tumor-hospedeiro, mostrando a invasão tumoral nos tecidos adjacentes (⇨). 100X HE.



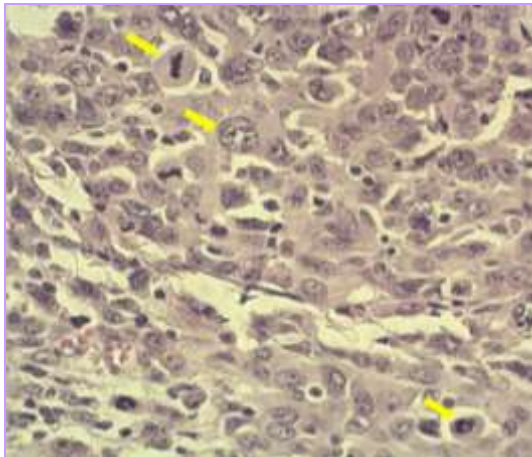
23C) Áreas de necrose intra-tumoral (⇨). 100X HE.



23D) Áreas de maior vascularização na periferia do tumor (⇒). 100X. HE.



23E) Áreas de hemorragia (A) e infiltrado inflamatório (B). 400X HE.



23F) Mitoses atípicas, pleomorfismo celular e perda de adesividade (⇒). 400X HE.

Nos resultados a seguir, foram apresentados em gráficos os dados de imunomarcção a partir do tempo de sete dias após a inoculação das células neoplásicas, correspondente ao período onde já havia evidência clínica da ocorrência de tumor em todos os grupos avaliados.

Através da técnica de imunohistoquímica, foi avaliado o perfil temporal da imunomarcção dos receptores CXCR2 no modelo animal de carcinoma espinocelular de língua, induzido pela inoculação de células da linhagem SCC158 em ratos Fischer 344. A quantificação da imunomarcção foi realizada através do programa NIH Image J e demonstra um aumento tempo-dependente da imunorreatividade para os receptores CXCR2, que se apresentou aumentado em aproximadamente três vezes, entre 14 e 40 dias (FIGURA 24).

A FIGURA 25 mostra que a imunomarcção do receptor CXCR2 no tecido normal (sem tumor), ocorre no interior dos vasos sanguíneos (A) e que as células epiteliais normais não apresentam marcação (B). Após a indução do tumor, observa-se imunomarcção positiva (\Rightarrow) em todos os tempos experimentais, sendo que houve aumento em todos os tempos quando comparados à primeira semana de desenvolvimento do tumor (7 dias).

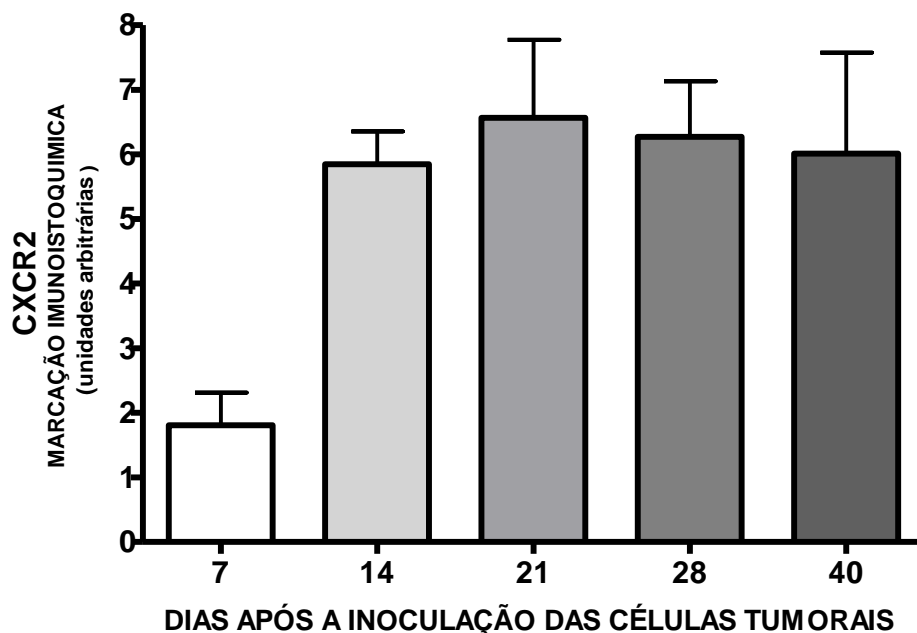


FIGURA 24. Imunomarcção do receptor CXCR2 para quimiocinas no modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunohistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.

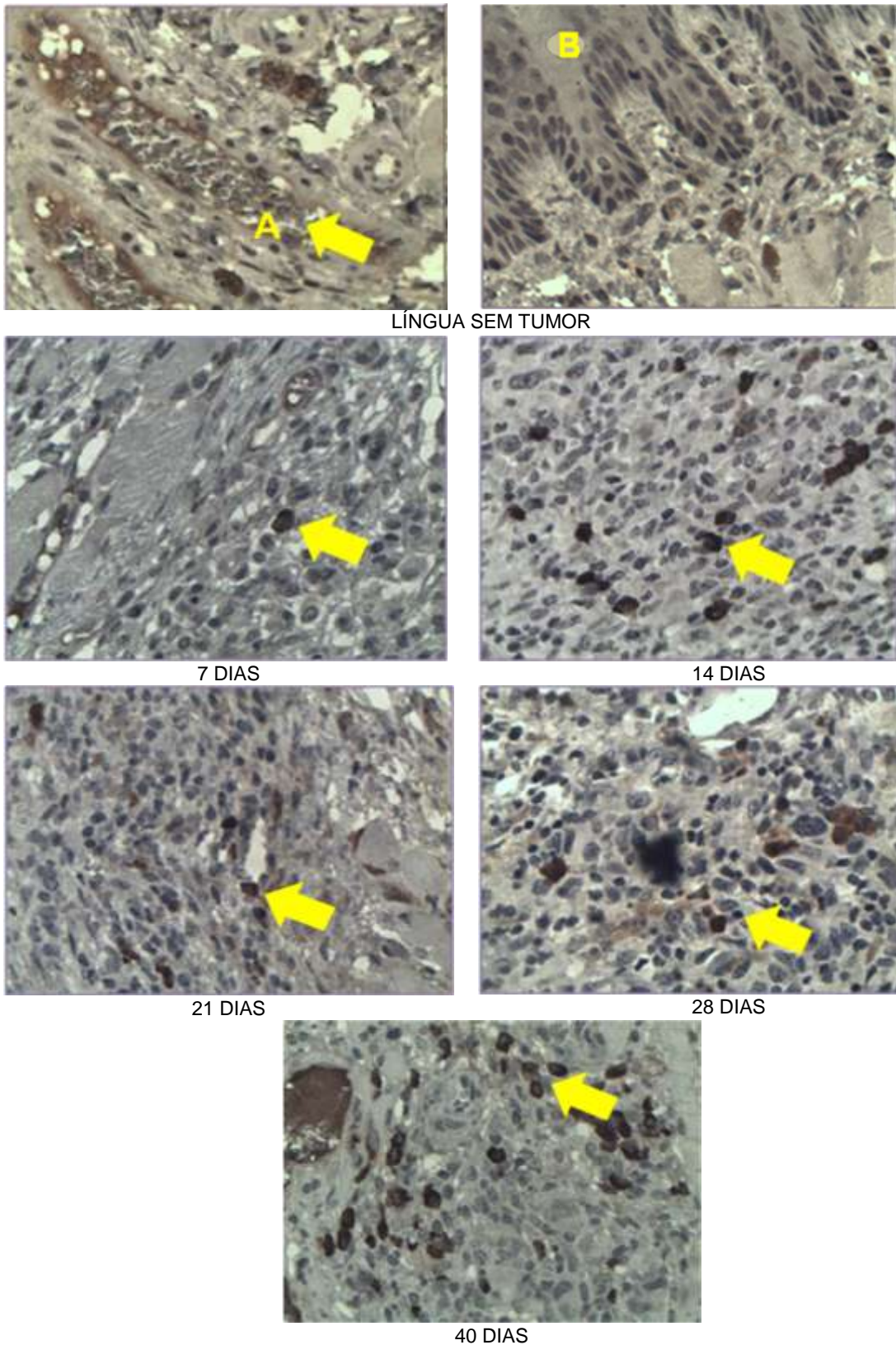


FIGURA 25. Imunomarcção do receptor CXCR2 (\Rightarrow) para quimiocinas no modelo experimental de carcinoma espinocelular de língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias de experimento. Nos ratos sem tumor, observa-se a imunomarcção do receptor no vaso sanguíneo (A) enquanto que não há marcação nas células epiteliais normais. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico; aumento de 400X. Técnica de Imunoistoquímica.

Utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente para a avaliação do receptor CXCR2, foram avaliadas as imunomarcações de VEGF e Caspase-3, nos mesmos grupos experimentais em que foi avaliado o receptor CXCR2.

A imunomarcação da Caspase-3 ativa não foi observada na língua sem tumor (FIGURAS 27 A). Nos grupos com tumor, a imunomarcação da enzima foi observada em todos os tempos experimentais (FIGURA 27). A análise do gráfico indica que houve aumento de aproximadamente quatro vezes, em 28 e 40 dias, em relação ao grupo de sete dias (FIGURA 26).

Em relação ao VEGF, foi observada imunopositividade nos animais do grupo controle, havendo aumento expressivo deste parâmetro em todos os grupos com tumor. Ressalta-se que no grupo controle, a marcação ocorre predominantemente em vasos, sem marcação aparente das células epiteliais. Por outro lado, nos grupos teste (com tumor), observa-se imunodeteção marcante de VEGF nas células epiteliais neoplásicas (FIGURAS 28 e 29).

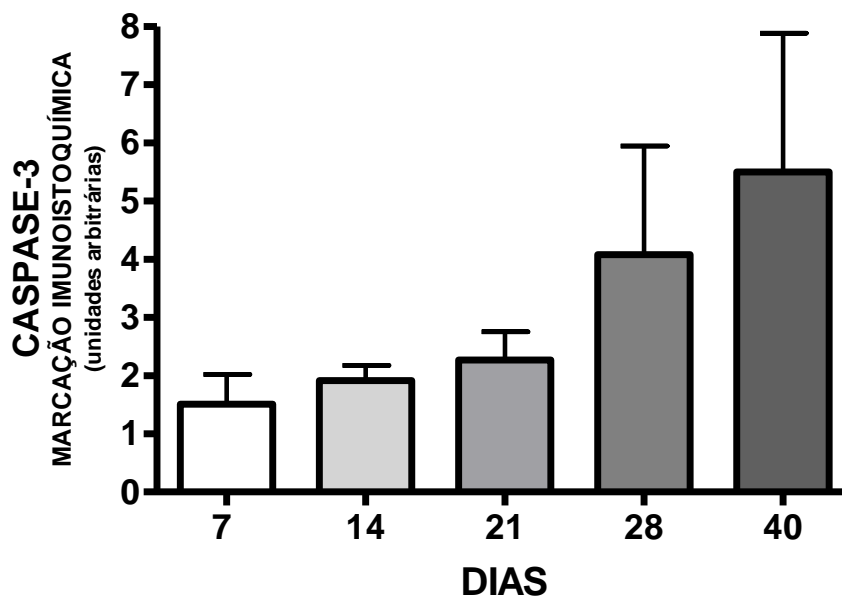


FIGURA 26. Imunomarcação da caspase-3 no modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunoistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.

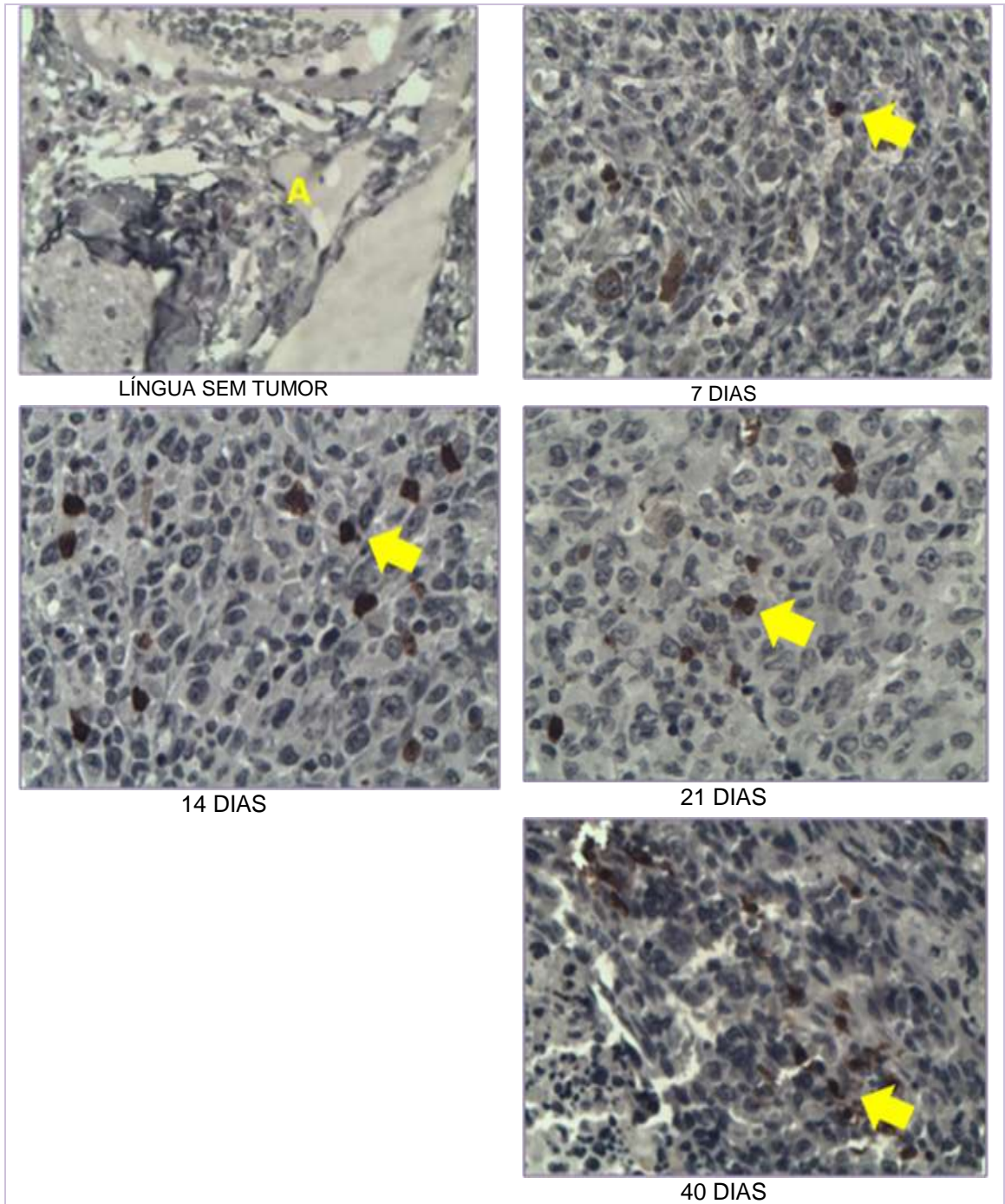


FIGURA 27. Imunomarcção da caspase-3 (⇒), marcador de apoptose celular, no modelo experimental de carcinoma espinocelular de língua, em ratos F344, nos tempos de 7, 14, 21, 28, 40 dias de experimento. Não houve marcação no rato sem tumor (A). Fotomicrografia obtida em microscópio óptico; aumento de 400X. Técnica de Imunoistoquímica.

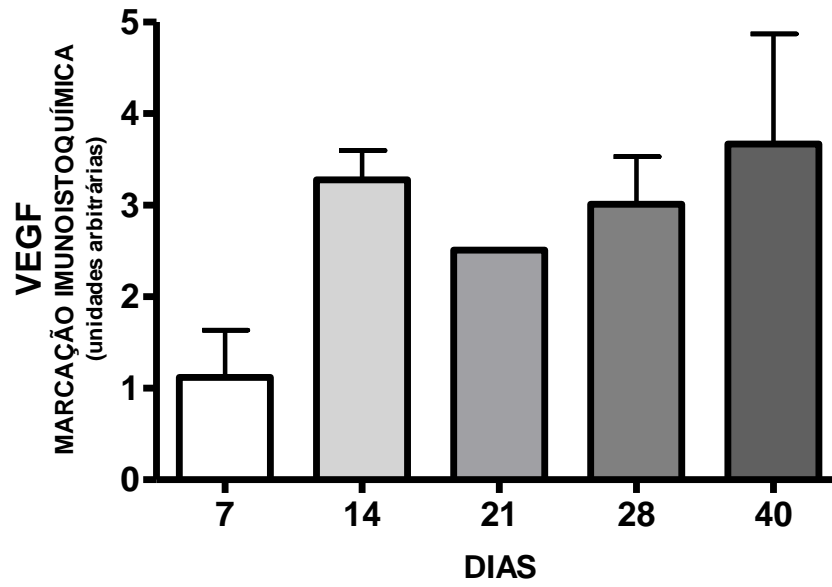


FIGURA 28. Imunomarcção do VEGF no modelo experimental de carcinoma espinocelular de língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias, a partir da técnica de imunoistoquímica. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes.

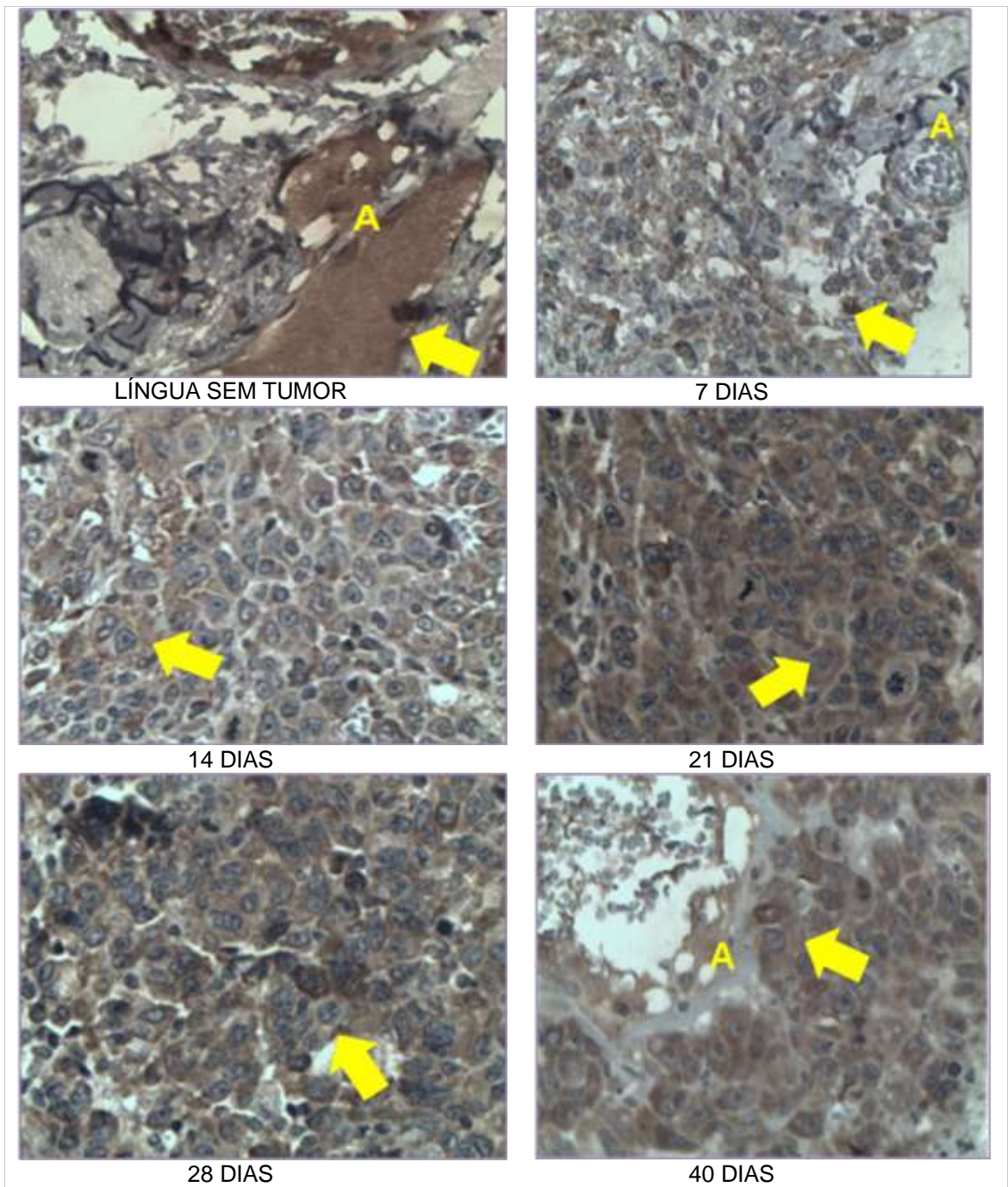


FIGURA 29. Imunomarcção do VEGF (\Rightarrow), marcador de angiogênese, no modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua, em ratos F344, nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 40 dias de experimento. No rato sem tumor houve marcação nos vasos (A) enquanto que nos demais tempos observa-se também a presença de VEGF nas células tumorais (\Rightarrow). Fotomicrografia obtida em microscópio óptico; aumento de 400X. Técnica de Imunoistoquímica.

DISCUSSÃO

O número de novos casos de câncer oral aumenta a cada ano, chegando à cerca de 300.000 novos casos, em todo o mundo (Goodman, 2009). Nos Estados Unidos, são 35.000 casos diagnosticados e 7.500 mortes anualmente (Wang et al., 2009). Esse aumento contínuo da incidência de câncer em todo o mundo tem levado as empresas farmacêuticas a aumentarem os investimentos no desenvolvimento de novos compostos para terapias anti-câncer. Em 2008, os investimentos realizados pelas empresas farmacêuticas foram de US\$ 2,9 bilhões, sendo estimados em cerca de US\$ 3,3 bilhões para 2013, superando os investimentos feitos na área de produtos para doenças cardiovasculares (Goodman, 2009). Assim, a identificação de novos alvos para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias, bem como a definição de mecanismos relacionados com a progressão tumoral, são fatores fundamentais no campo das pesquisas oncológicas.

Apesar dos avanços significativos no tratamento de outras neoplasias, a morbidade e mortalidade, associadas ao câncer oral, permanecem elevadas (Choi e Myers, 2008; McDowell, 2008; Wang et al., 2009b). A cirurgia é o tratamento inicial considerado definitivo para o câncer oral. A radioterapia pode ser utilizada em conjunto, nos casos avançados. Já a quimioterapia, considerada paliativa até os anos 1970, tem apresentado respostas relativamente satisfatórias, com a introdução da cisplatina. Entretanto, ao contrário de neoplasias em outras localizações, a quimioterapia para as neoplasias da cavidade oral e cabeça e pescoço, não se traduz em controle em longo prazo do carcinoma de células escamosas (Shah e Gil, 2009). Diferentes estudos têm buscado o desenvolvimento de estratégias para o tratamento do câncer oral que possibilitem o controle da atividade das células tumorais e, com isso, a redução do volume do tumor (Wang et al., 2004; Tsuji et al., 2007).

Resgatando a observação feita por Virchow em 1863, a respeito da presença de leucócitos nos tecidos neoplásicos, que estabelecia conexão entre inflamação e câncer e sugeria a origem da neoplasia em áreas de inflamação crônica, autores como Balkwill e Mantovani, desde o final da década de 1990, vêm apresentando uma nova visão sobre o significado do infiltrado inflamatório, associado ao microambiente tumoral (Balkwill e Mantovani, 2001; Wilson e Balkwill,

2002; Balkwill 2003; Mantovani et al., 2008; Mantovani e Pierotti, 2008; Mantovani, 2009). De fato, muitas das neoplasias comuns apresentam processo inflamatório crônico prévio como co-fator de carcinogênese: infecção por HPV (câncer de colo útero), gastrite/úlcera associada a *H. Pylori* (câncer de estômago) e DPOC (câncer de pulmão) (Moss e Blaser, 2005; Aggarwal e Gehlot, 2009).

Em artigo de revisão, Dancey e Chen (2006) apresentaram diferentes agentes que atuam sobre alvos específicos das neoplasias, podendo ser usados sozinhos ou em combinações, salientando a importância dos estudos pré-clínicos para determinar as estratégias mais promissoras e superar os problemas atuais dos tratamentos disponíveis na clínica. Neste contexto, as quimiocinas e seus receptores têm se mostrado como excelentes alvos para novos agentes terapêuticos, inclusive para o tratamento do câncer.

Do ponto de vista farmacológico, existem diversas maneiras de evidenciar a presença de um receptor em um sistema biológico: (i) através da avaliação do efeito de um agonista, (ii) pela utilização de um antagonista seletivo ou, (iii) pela determinação da imunomarcagem desse receptor nas células ou tecidos (Kenakin, 2008). Neste sentido, estas três abordagens experimentais foram utilizadas no presente estudo, a fim de determinar a participação dos receptores CXCR2 para quimiocinas no carcinoma espinocelular oral.

No presente trabalho foi testado o antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB 225002, sobre a viabilidade de células de carcinoma das linhagens SCC158, HN30 e HaCaT. Tanto na linhagem de carcinoma de ratos, como na de humanos, houve inibição significativa da viabilidade celular, de maneira concentração e tempo-dependente. Já na linhagem de queratinócitos humanos normais, houve discreta redução da viabilidade celular em algumas concentrações e tempos testados, sendo que estes efeitos não foram estatisticamente significativos. Esta característica tem valor significativo também clinicamente, uma vez que sugere menores efeitos inespecíficos sobre as células normais e, conseqüentemente, potencial de toxicidade reduzido.

O trabalho conduzido por Wang et al. (2006) demonstrou aumento da imunodeteção das quimiocinas CXCL1/GRO- α e CXCL2/GRO- β e dos receptores CXCR2 em tecidos de carcinoma de esôfago, em comparação com tecidos normais adjacentes. Ademais, a incubação *in vitro* do antagonista seletivo dos receptores

CXCR2, o SB225002, causou a redução de aproximadamente 40 % da proliferação da linhagem de carcinoma de células escamosas de esôfago WHCO1, quando avaliado na concentração de 400 nM. O bloqueio dos receptores CXCR2, através do uso de um anticorpo anti-CXCR2, reduziu de modo significativo a microvascularização em modelo de angiogênese envolvendo células de carcinoma de pâncreas (Wente et al., 2006). Outro estudo utilizando um anticorpo anti-CXCR2, mostrou uma inibição da progressão de lesões pré-malignas, bem como indução de apoptose de células endoteliais no interior da lesão, em um modelo de câncer de pulmão em camundongos (Wislez et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, confirmando as evidências acerca da relevância dos receptores CXCR2 em carcinoma demonstrando, pela primeira vez, a importância destes receptores sobre células de carcinoma oral.

Em relação às percentagens de inibição observadas no presente estudo, as mesmas variaram entre 30 e 50 %, nas concentrações mais elevadas (400 a 3200 nM), estando de acordo com o trabalho de Wang et al. (2006). De forma interessante, um estudo conduzido por Kim et al. (2000), utilizando várias linhagens de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de origem humana, incluindo a linhagem HN30 empregada no presente estudo, mostraram que a incubação de cisplatina, em concentrações tão elevadas quanto 10000 nM, produziu a inibição média de 40 % da proliferação desta linhagem. Estes resultados sugerem que o SB225002 seria mais potente do que a cisplatina sobre este tipo de tumor. É importante ressaltar, que a cisplatina e outros compostos quimioterápicos dessa classe apresentam efeitos colaterais graves e crônicos em humanos (Kim et al., 2001).

Outras evidências prévias demonstraram efeitos relevantes para o antagonista testado no presente estudo, o SB225002, em modelos pré-clínicos de dor e inflamação. Por exemplo, os efeitos do bloqueio do receptor CXCR2 foram descritos por Barsante e colaboradores (2008), em estudo de artrite reumatóide induzida em ratos. Mais recentemente, Manjavachi et al. (2009) demonstraram que o tratamento sistêmico com o SB225002 foi capaz de reduzir respostas álgicas em diferentes modelos de nocicepção em camundongos. Cabe ressaltar que, nesses estudos, o SB225002 foi desprovido de efeitos tóxicos significativos, mesmo quando testado em protocolos crônicos de tratamento, reforçando a possível aplicação

segura deste antagonista (Manjavachi et al., 2009). Resta ainda investigar qual seria o efeito do tratamento *in vivo* com este antagonista sobre o desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral.

Como mencionado anteriormente, tanto células do tumor, quanto células do estroma são capazes de produzir quimiocinas. Estas quimiocinas poderiam agir direta ou indiretamente sobre o endotélio vascular, recrutando leucócitos para o tumor. Dados da literatura têm sugerido que, após a ativação, os leucócitos liberam fatores angiogênicos, mitogênicos, enzimas proteolíticas e fatores quimiotáticos, recrutando mais células inflamatórias e estimulando a angiogênese, o que poderia explicar os seus efeitos sobre o crescimento tumoral (Yan et al., 2006). De fato, a IL-8/CXCL8 é uma das quimiocinas CXC pró-inflamatórias que ativam múltiplas vias após a interação com o receptor CXCR2, regulando de maneira importante o microambiente tumoral (Waugh e Wilson, 2008). Desta forma, a ação inibitória observada para o antagonista seletivo dos receptores CXCR2, o SB225002, sobre a viabilidade das linhagens de carcinoma de células escamosas, poderia estar relacionada com um ou mais dos mecanismos descritos acima. Entretanto, estudos adicionais ainda se fazem necessários para esclarecer os possíveis mecanismos anti-tumorais do SB225002. No trabalho realizado por Wang et al. (2006), com células de câncer de esôfago, foi demonstrado que estratégias anti-CXCR1/2 foram capazes de modular a ativação da MAP-quinase ERK1/2. Outras evidências têm demonstrado a relação entre os receptores CXCR2 e MAP-quinases/PI3-quinase em gliomas (Brat et al., 2005). Gavard et al. (2009) demonstraram que a ativação dos receptores CXCR2 pela IL-8 leva à ativação da PI3-quinase- γ , em um modelo de hiperpermeabilidade vascular em camundongos, sendo este efeito bloqueado pelo antagonista seletivo dos receptores CXCR2, SB225002. É possível inferir que o bloqueio da ativação de MAP-quinases ou das PI3-quinases poderia estar implicado nos efeitos observados para o SB225002 no presente estudo. Revisão recente publicada por Waugh e Wilson (2008) faz a correlação entre a estimulação das MAP-quinases, dentre outras vias de sinalização celular, após a ativação dos receptores CXCR2 no ambiente tumoral.

A presença do receptor CXCR2, tanto nas células humanas (HN30), como nas de ratos (SCC158), foi adicionalmente confirmada pela incubação com os agonistas IL-8/CXCL8 e CINC-1, respectivamente. Ambos os agonistas causaram

proliferação concentração-dependente de células submetidas a uma condição prévia de privação nutricional (*starving*). Essa característica também foi demonstrada por Watanabe e colaboradores (2002), que observaram o efeito proliferativo da IL-8 e também de seus receptores, na linhagem HSC4 de carcinoma humano. A participação da IL-8 na proliferação de diferentes linhagens de carcinoma de células escamosas, tanto de tumor primário (HN30), como em linhagens de tumor metastático (HN12, HN4) foi confirmada por Christofakis e colaboradores (2008).

Após a identificação do receptor CXCR2 nas linhagens celulares de carcinoma oral humano e de ratos, foi desenvolvido um modelo experimental de carcinoma espinocelular em língua em ratos Fisher 344. Atualmente, a cultura de células representa um dos métodos mais utilizados para o *screening* de novos compostos com ação antineoplásica. Entretanto, estes modelos podem não ter boa correlação com os efeitos *in vivo* das novas moléculas selecionadas (Aggarwal et al., 2009). Desta forma, torna-se relevante estender os dados obtidos com células em cultura, através de modelos *in vivo*.

Diferentes modelos já foram desenvolvidos para o estudo do comportamento, evolução e tratamento desta neoplasia, principalmente com o uso de carcinógenos aplicados topicamente em língua de hamsters ou, pela injeção de células tumorais em camundongos imunocomprometidos (Omura et al., 1999, Myers et al., 2002, Murphy et al., 2005; Nomura et al., 2006). Hasegawa e colaboradores (1998) utilizaram modelo com ratos Fischer 344 e células da linhagem SCC158, para avaliar tratamento com eletroquimioterapia sobre neoplasias de língua. Neste trabalho, a implantação das células tumorais foi feita em duas fases: primeiramente, 5×10^6 células foram inoculadas no dorso do animal. Cerca de duas semanas depois, quando o tumor atingia cerca de 1 cm, o mesmo era removido, as células ressuspensas novamente e, só então, injetadas na língua do animal. Neste protocolo, o tumor se tornava visível, aproximadamente 10 dias após a segunda inoculação. Este mesmo modelo foi utilizado posteriormente por Nagamine e colaboradores, em 2006, para estudar alterações dolorosas em tumores de gengiva e sua relação com a invasibilidade do tecido ósseo. Em 2004, com o objetivo de facilitar o estudo dos carcinomas orais e também de metástases, Djalilian e colaboradores desenvolveram um modelo utilizando ratos Fischer 344 imunocompetentes, com a inoculação de células de carcinoma oral no flanco dos

animais. As características clínicas e microscópicas, bem como o comportamento em relação à metástase, permitiram que os autores o considerassem um bom modelo experimental, com comportamento muito semelhante ao das neoplasias de mucosa de cabeça e pescoço. Em todos os modelos, foram consideradas as características clínicas e microscópicas para identificar a presença do tumor.

Os modelos de indução tumoral por agentes químicos possuem características microscópicas de diferenciação muito próximas ao carcinoma espinocelular da cavidade oral em humanos. Entretanto, apresentam como desvantagens principais, o longo tempo necessário para o estabelecimento das lesões (até 5 meses), além da alta toxicidade das substâncias químicas, comumente derivadas de antracenos (Omura et al., 1999). Em relação aos modelos que utilizam a injeção de células tumorais em camundongos imunocomprometidos (*nude*), o problema maior está associado com a manutenção destes animais, que são altamente suscetíveis a infecções, necessitando de instalações especiais de manutenção (Myers et al., 2002). Geralmente, esses modelos empregam células de origem humana e, conseqüentemente, as características genéticas e fisiológicas destas células podem mudar após a inoculação em camundongos (Aggarwall et al., 2009).

No modelo experimental apresentado neste trabalho, a injeção submucosa de 5×10^6 células da linhagem SCC158, diretamente na língua de ratos Fischer 344, produziu um tumor de comportamento semelhante ao observado em humanos, sendo realizado em uma só etapa experimental, estando clinicamente estabelecido após 7 dias da indução tumoral. Em cerca de 4 semanas, as características clínicas observadas lembraram os aspectos clínicos do carcinoma espinocelular oral de humanos. As características histopatológicas observadas nas lesões, em todos os tempos deste modelo experimental, foram semelhantes às descritas na literatura por vários autores (Anneroth et al., 1986; Odell et al., 1994; Pindborg, 1997; WHO, 2005; Lourenço et al., 2007). Uma característica particular observada neste modelo foi o alto grau de indiferenciação das células tumorais; assim, seria interessante utilizar marcadores específicos para células epiteliais, a fim de completar a padronização do modelo. Independente dessas limitações, o modelo apresenta vantagens claras em relação aos outros descritos na literatura, como o menor tempo de indução e a utilização de animais imunocompetentes, além da relativa facilidade de execução

técnica. Neste sentido, este modelo poderia ser útil para a avaliação farmacológica pré-clínica de novas moléculas candidatas para o tratamento do carcinoma espinocelular da cavidade oral. Ademais, a evolução das lesões observadas no presente modelo permitiria a realização de protocolos preventivos e terapêuticos, bem como, a associação de novas moléculas com fármacos quimioterápicos já utilizados clinicamente.

Para a identificação do receptor CXCR2 por meio de análise imunoistoquímica, foram utilizadas amostras obtidas de língua de ratos Fisher 344, inoculados com células SCC158. Os resultados demonstram que houve aumento marcante da imunopositividade para os receptores CXCR2, o que já foi evidente 7 dias após a inoculação tumoral, permanecendo elevada até o final do período de observação, aos 40 dias após a indução do tumor. O aumento da imunodeteção dos receptores CXCR2 foi observado em biópsias obtidas de pacientes com carcinoma de esôfago, por meio de RT-PCR *end-point* (Wang et al., 2006; 2009). Ademais, a imunomarcção de receptores CXCR2 para quimiocinas também foi observada em amostras de melanoma de pele, por meio de análise imunoistoquímica (Varney et al., 2006). Embora, os dados do presente estudo mostrem evidências convincentes acerca da imunomarcção aumentada dos receptores CXCR2 no modelo de carcinoma de língua em ratos, os seguintes pontos devem ser considerados: (i): a técnica de imunoistoquímica tem caráter qualitativo - seria relevante a complementação desta técnica por meio de outras abordagens para detecção de receptores, tais como PCR em tempo real, ensaios de união específica com radioligantes ou *western-blot*; (ii) não é possível afirmar, com precisão, que o aumento da imunomarcção dos receptores CXCR2 ocorreu exclusivamente em células tumorais ou; (iii) talvez, o aumento da imunomarcção de receptores CXCR2 observada no presente estudo esteja relacionada com alterações em células inflamatórias do ambiente tumoral ou, de células endoteliais de pequenos vasos que nutrem o tumor. Estes questionamentos estão de acordo com a revisão recente publicada por Mantovani et al. (2008), que discute uma série de pontos que ainda permanecem por ser esclarecidos, a respeito da relação entre câncer e inflamação.

O grau de malignidade tumoral está relacionado com o crescimento de novos vasos sanguíneos, um processo fundamental para a progressão,

agressividade e capacidade de metástase do tumor. Dentre os diversos mediadores envolvidos na angiogênese, o VEGF apresenta um papel decisivo. O VEGF é uma glicoproteína dimérica que age como regulador da vasculogênese e hematopoiese durante a embriogênese. Na idade adulta, este fator induz angiogênese em condições fisiológicas, como cicatrização, assim como, em alterações patológicas, incluindo câncer e artrite reumatóide. A maior parte de seus efeitos é mediada pela ativação de receptores pertencentes à superfamília tirosina-quinase, denominados VEGFR-1, -2 e -3, além de alguns co-receptores (Ferrara et al., 2002; 2003; Olsson et al., 2006).

A expressão elevada de VEGF tem sido correlacionada com pior prognóstico no carcinoma espinocelular oral (Uehara et al., 2004; Tse et al., 2007; Choi e Myers, 2008; Sappayatosok et al., 2009). No modelo experimental apresentado neste estudo, foi evidenciado, ao nível macroscópico, o aumento expressivo do número de vasos em regiões próximas ao tumor. Além disso, os experimentos de imunistoquímica revelaram o aumento da imunodeteção de VEGF nas amostras de língua de rato. De forma interessante, este aumento apresentou correlação temporal com a marcação dos receptores CXCR2, bem como, com a evolução do tumor. Dados da literatura têm demonstrado que quimiocinas ELR+, tais como aquelas que ativam os receptores CXCR2, são potentes indutores de angiogênese (Moore et al., 1998; Romagnani et al., 2004; Karl et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que a ativação de receptores pela IL-8 pode induzir a fosforilação do receptor VEGFR-2 em células endoteliais, alterando a permeabilidade da barreira endotelial (Petreaca et al., 2007). Ademais, foi demonstrado que a imunomarcação de quimiocinas CXC, como IL-8 e GRO- α , é aumentada após a exposição de células endoteliais ao VEGF (Karl et al., 2005). Tanto os efeitos da IL-8, quanto do VEGF, podem convergir para a ativação de pequenas GTPases, como a Rac1, resultando na estimulação da quinase p21, e, finalmente em neovascularização (Gavard et al., 2009). É possível inferir que o aumento dos receptores CXCR2 e sua consequente ativação poderiam resultar em aumento de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF ou, ainda, das vias de sinalização ativadas pelos receptores para VEGF. Por outro lado, o aumento da imunomarcação dos receptores CXCR2 e do VEGF poderia ocorrer de maneira independente, apresentando efeitos aditivos sobre a evolução

tumoral. Experimentos utilizando ferramentas farmacológicas anti-CXCR2 e anti-VEGF seriam fundamentais para elucidar esta proposição.

A transformação neoplásica maligna tem sido associada com o aumento marcante das taxas de apoptose e proliferação, como observado pela avaliação da imunodeteção de p53 e Bcl-2 em tumores colorretais (Sinicrope et al., 1996). Os autores sugeriram que a apoptose pode ser um fator fundamental na regulação do crescimento destes tumores. De acordo com os resultados do presente estudo, houve o aumento expressivo da imunomarcação para caspase-3, no modelo de carcinoma espinocelular na língua de ratos, especialmente nos períodos de observação de 28 e 40 dias. A caspase-3 é uma das proteases mais específicas relacionadas ao processo de apoptose (Zhang et al., 2009). Correlação semelhante entre a progressão tumoral (medida através do índice mitótico) e o aumento da imunomarcação de caspase-3 foi observada em biópsias de retinoblastoma (Sitorus et al., 2009). Foi ainda demonstrado o aumento na imunopositividade para caspase-3, tanto no epitélio, quanto no estroma, de biópsias de carcinoma colorretal, em comparação com a mucosa adjacente (Koelink et al., 2009). De forma interessante, tem sido descrito que carcinomas orais apresentam índice apoptótico maior do que aquele observado no epitélio normal. Dados da literatura sugerem que em tumores de diferentes origens, a imunomarcação de caspase-3 pode-se apresentar aumentada ou diminuída em relação ao tecido normal. A sua marcação foi avaliada em 39 amostras de epitélio oral normal e em 54 de carcinoma de células escamosas. Assim como demonstrado no presente estudo, as amostras de carcinoma humano também apresentaram marcação mais intensa para caspase-3 em relação ao tecido normal. A intensidade da imunomarcação, bem como a percentagem de células positivas para este marcador, foram inversamente associadas com o grau de diferenciação (Hague et al., 2004). Outro trabalho também demonstrou imunomarcação significativa para caspase-3 em tumor de células granulares da cavidade oral (Chrysomali et al., 2003). Por outro lado, trabalho conduzido por Andressakis e colaboradores (2008) demonstrou a redução simultânea das caspases-3 e 8 no carcinoma de células escamosas em humanos. Embora os dados deste estudo indiquem fortemente a ocorrência do aumento na imunodeteção de caspase-3, que parece ser proporcional à evolução do tumor, outros fatores relacionados à apoptose também precisariam ser investigados. Por

exemplo, Bcl-2 é uma proteína diretamente envolvida na regulação da sobrevivência de células tumorais, que exerce parte seus efeitos por regular a presença de quimiocinas CXC pró-angiogênicas, tais como a IL-8 (Karl et al., 2005). Assim, seria interessante avaliar como estaria a imunomarcagem de Bcl-2 nas amostras obtidas no modelo de indução tumoral descrito nesse trabalho.

CONCLUSÕES

A partir dos modelos experimentais utilizados, foi possível confirmar a participação dos receptores CXCR2 para quimiocinas no carcinoma espinocelular da cavidade oral. De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que antagonistas seletivos e de natureza não-peptídica, como o SB225002 seriam alternativas promissoras para o tratamento deste tipo de câncer, especialmente em associação com outras abordagens já existentes. Embora a viabilidade das células tumorais não tenha sido completamente abolida por esse antagonista, as percentagens de inibição observadas ainda são superiores àquelas obtidas para outros agentes quimioterápicos clássicos.

Os estudos *in vivo* permitiram a padronização de um modelo experimental que pode ser útil para a avaliação pré-clínica de novos compostos com possível efeito sobre o carcinoma oral. Ademais, a padronização desse modelo permitiu confirmar a relevância dos receptores CXCR2 para o estabelecimento e/ou a progressão do carcinoma espinocelular oral, como demonstrado pelo aumento da marcação desses receptores, por meio de análise imunoistoquímica. Finalmente, a imunomarcação dos receptores CXCR2 parece estar diretamente relacionada com efeitos pró-angiogênicos, uma vez que foi observado aumento concomitante do VEGF nas mesmas amostras. Por outro lado, o aumento da imunomarcação da proteína pró-apoptótica, caspase-3, foi subsequente à imunomarcação do receptor CXCR2 e do VEGF, talvez como mecanismo de defesa ou controle do crescimento do tumor.

Ainda precisam ser avaliados os possíveis efeitos do tratamento com o SB225002 no modelo *in vivo* de carcinoma espinocelular da cavidade oral. Além disso, os mecanismos relacionados com as ações antitumorais desse antagonista, ainda devem ser esclarecidos. No momento, ainda não é possível definir quais as células pertencentes ao micro-ambiente tumoral, incluindo neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e/ou células epiteliais do tumor, seriam responsáveis pelo aumento da imunomarcação dos receptores CXCR2, aqui observado. De qualquer forma, o presente estudo contribui para um melhor entendimento acerca dos mecanismos relacionados com as neoplasias malignas da cavidade oral de origem epitelial.

REFERÊNCIAS

- Acosta JC, Gil J. A Role for CXCR2 in Senescence, but What about in Cancer? *Cancer Res* 2009; 69: (6) 2167–70.
- Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000; 65(9): 5269–5277.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11):1605-21.
- Aggarwal BB, Danda D, Gupta S, Gehlot P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78(9):1083-94.
- Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(4):351-69.
- Andressakis D, Lazaris AC, Tsiambas E, Kavantzias N, Rapidis A, Patsouris E. Evaluation of caspase-3 and caspase-8 deregulation in tongue squamous cell carcinoma, based on immunohistochemistry and computerised image analysis. *J Laryngol Otol.* 2008; 122(11):1213-8.
- Anneroth G, Batsakis JG, Luna M. Malignancy grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. *Scand J Dent Res* 1986; 94: 347-58.
- Arya M, Patel HRH, Williamson M. Chemokines: key players in cancer. *Curr Med Res Opin* 2003; 19(6): 557-64.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human Chemokine: An Update. *Annu. Rev. Immunol* 1997; 15:675–705.
- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250(2):91-104.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357(9255):539-45.
- Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Sem Immunol* 2003; 15: 49–55.
- Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C, Tafuri WL, Poole S, Cunha FQ, Bertini R, Teixeira MM. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(5):992-1002.
- Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue Cancer: Is There a Difference in Survival Compared With Other Subsites in the Oral Cavity? *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(2):229-36.
- Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:38–52.
- Bernardi A, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini, AMO. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. *Eur J Pharmacology* 2006; 532: 214–222.

- Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. LR+CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharm & Therapeutics* 2006; 112:139–149.
- Bone-Larson CL, Simpson KJ, Colletti LM, Lukacs NW, Chen SC, Lira S, Kunkel SL, Hogaboam CM. Chemokines - The role of chemokines in the immunopathology of the liver. *Immunol Rev* 2000; 177:8-20.
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005; 7(2):122-33. Review.
- Brinkman, MN; Wong, DTW. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2006; 18:228–233.
- Catusse J, Faye P, Loillier B, Cremers B, Franck RM, Luccarini JM, Pruneau D, Paquet JL. Cloning and characterization of guinea pig interleukin-8 receptor. *Biochem Pharmacol.* 2003a; 66(7):1171-80.
- Catusse J, Loillier B, Pruneau D, Paquet JL. Characterization of the molecular interactions of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB225002) with the human CXCR2. *Biochem Pharmacol* 2003b; 65: 813-821
- Chandu A, Adams G, Smith, ACH. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:514-520.
- Chandu A, Smith, ACH, Rogers SN. Health-Related Quality of Life in Oral Cancer: A Review. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:495-502.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354:610-21.
- Chen L, Pei G, Zhang W. An Overall Picture of Chemokine Receptors: Basic Research and Drug Development. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1045-1055.
- Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J Dent Res* 2008; 87: 14.
- Christofakis EP, Miyazaki H, Rubink DS, Yeudall WA. Roles of CXCL8 in squamous cell carcinoma proliferation and migration. *Oral Oncol.* 2008; 44(10): 920-6.
- Chrysomali E, Nikitakis NG, Tosios K, Sauk JJ, Papanicolaou SI. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(5): 566-72.
- Chuntharapai A, Kim KJ. Regulation of the expression of IL- 8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol* 1995; 155(5): 2587–94.
- Cochrane. Systematic Reviews on Oral Cancer 2007. Disponível em: <http://oralcancerreviews.co.uk>. Acesso em dezembro, 2009.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
- Danaei G, Hoorn SV, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors 2005; 366:1784–93

- Dancey JE, Chen HX. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(8):649-59.
- Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* 1997; 186(8):1201-12.
- Devalaraja RM, Nanney LB, Qian Q, Du J, Yu Y. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000; 115:234–44.
- Djalilian HR, Lessan K, Grami V, Pambuccian SE, Spellman SR, Low WC, Hall WA, Ondrey FG. A new immune-competent animal model of mucosally derived squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131:781-3.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications, *Semin. Oncol.* 2002; 29:10–14.
- Ferrara N., Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med.* 2003; 9: 669–76.
- Frederick MJ, Clayman GL. Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3(19):1-18.
- Gavard J, Hou X, Qu Y, Masedunskas A, Martin D, Weigert R, Li X, Gutkind JS. A role for a CXCR2/phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling axis in acute and chronic vascular permeability. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(9):2469-80.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001; 2 (2):106-115.
- Goodman M. Market watch: sales trends by therapeutic area: 2008-2013E. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(9):689.
- Guha S et al Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(7):2738-45.
- Hague A, Eveson JW, MacFarlane M, Huntley S, Janghra N, Thavaraj S. Caspase-3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally hv differentiated normal oral epithelium but is increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumour stage. *J Pathol.* 2004; 204(2):175-82
- Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 1995; 155(3): 1428–33.
- Hasegawa H Kano M, Hoshi N, Watanabe K, Satoh E, Nakayama B, Suzuki T. An electrochemotherapy model for rat tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 249–54.
- Hidaka H, Ishiko T, Furuhashi T, Kamohara H, Suzuki S, Miyazaki M, Ikeda O, Mita S, Setoguchi T, Ogawa M. Curcumin inhibits interleukin 8 production and enhances interleukin 8 receptor expression on the cell surface: impact on human pancreatic carcinoma cell growth by autocrine regulation. *Cancer* 2002; 95(6):1206-14.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991; 253(5025): 1278–80.

- Horuk R. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. *R Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(1):23-33. .
- Howard OMZ, Oppenheim JJ, Wang JJ. Chemokine as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *J Clin Immunol* 1999; 5(19): 280-292.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Head and neck epidermoid carcinoma. 2001; *Rev Bras Cancerol* 47(4): 361-76.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Falando sobre câncer de boca. 2002. Disponível em: <http://inca.gov.br> [falandosobrecancerdeboca2002].
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil. Estimativas 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
- Kadmani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(11):1599-605.
- Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol.* 2006 (4):639-51.
- Karl E, Warner K, Zeitlin B, Kaneko T, Wurtzel L, Jin T, Chang J, Wang S, Wang CY, Strieter RM, Nunez G, Polverini PJ, Nör JE. Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines. *Cancer Res.* 2005; 65(12):5063-9.
- Keane MP, Burdick MD, Xue YY, Lutz M, Belperio JA, Strieter RM. The Chemokine receptor, CXCR2, mediates the tumorigenic effects of ELR⁺ CXC chemokines. *Chest* 2004; 125:133 s. (a)
- Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in a Murine Model of Lung Cancer. *J Immunol* 2004, 172:2853–2860. (b)
- Kenakin T. Functional assays as prismatic views of drug activity: relevance to new drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res.* 2008; 28(1-2):109-25.
- Kershaw MH, Wang G, Westwood JA, Pachynski RK, Tiffany HL, Marincola FM, Wang E, Young HA, Murphy PM, Hwu P. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther* 2002; 13(16):1971-80.
- Kim HE, Krug MA, Han I, Ensley J, Yoo GH, Forman JD, Kim HR. Neutron radiation enhances cisplatin cytotoxicity independently of apoptosis in human head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):4142-27.
- Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia* 2001; 3(1):33-42.
- Koelink PJ, Sier CF, Hommes DW, Lamers CB, Verspaget HW. Clinical significance of stromal apoptosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(5):765-73.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang JM. Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. *Cell & Molec Immunol* 2004; 1(2):95-104.

- Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 1992; 267(23):16283–7.
- Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001; 7(10): 3298-304.
- Li A, Varney ML, Singh RK. Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis*. 2004; 21(7): 571-9.
- Lourenço, SQC et al. Histological Classifications of Oral Squamous Cell Carcinoma: a Review of the Proposed Systems. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 325-33.
- Manjavachi MN, Quintão NL, Campos MM, Deschamps IK, Yunes RA, Nunes RJ, Leal PC, Calixto JB. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. *Eur J Pain*. 2009 Mar. [Epub ahead of print].
- Mantovani A, Pierotti MA. Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer Lett*. 2008; 267(2):180-1.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203):436-44.
- Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 2009; 457(7225):36-7.
- Margaritescu CL, Pirici D, Simionescu C, Mogoanta L, Raica M, Stinga L, Ciurea R, Stepan A, Stinga A, Ribatti A. REVIEW: VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Roman J Morphol Embryol* 2009; 50(4):527–48.
- Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102:67-76.
- Matzer SP, Zombou J, Sarau HM, Ilinghoff MR, Ulrich Beuscher H. A synthetic, non-peptide CXCR2 antagonist blocks MIP-2-induced neutrophil migration in mice. *Immunobiology* 2004; 209: 225–33.
- McDowell JD. An Overview of Epidemiology and Common Risk Factors for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol Clin N Am* 2006; 29:277-94.
- McLeod NMH, Saeed NR, Ali EA. Oral cancer: Delays in referral and diagnosis persist. *Br Dent J* 2005; 198(11):681-4.
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci*. 2007; 27(20):5394-404.
- Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, Pantuck A, Figlin RA, Strieter RM. The Role of CXCR2/CXCR2 Ligand Biological Axis in Renal Cell Carcinoma. *J Immunol* 2005; 175: 5351–7.

- Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Polverini PJ, Strieter RM. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis*. 1998; 2(2):123-34
- Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*. 2006; 23(6):226.
- Moser B, Williman K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (suppl): 84-89.
- Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2(2):90-7.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(1):145-76.
- Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, Montironi R, Waugh DJJ. Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 Correlates with Cell Proliferation and Microvessel Density in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11): 4117-27.
- Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An Orthotopic Nude Mouse Model of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Clin Canc Res* 2002; 8: 293–8.
- Nagamine K, Ozaki N, Shinoda M, Asai H, Nishiguchi H, Mitsudo K, Tohno I, Ueda M, Sugiura Y. Mechanical Allodynia and Thermal Hyperalgesia Induced by Experimental Squamous Cell Carcinoma of the Lower Gingiva in Rats. *J Pain* 2006; 7(9):659-670.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- Nomura T, Shibahara T, Katakura A, Matsubara S, Takano N. Establishment of a murine model of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2007; 43(3):257-62.
- Odell EW, Jani P, Ahluwalia B, Levison, DA. The Prognostic Value of Individual Histologic Grading Parameters in Small Lingual Squamous Cell Carcinomas. *Cancer* 1994; 74:789-94.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5):359-71.
- Omura S, Tsuyuki Y, Ohta S, Bukawa H, Fujita K. *In vivo* antitumor effects of electrochemotherapy in a tongue cancer model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 57(8):965-72
- Onuffer JJ, Horuk R. Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci*. 2002; 23(10):459-67.
- Opdenakker G, Van Damme J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int. J. Dev. Biol*. 2004; 48: 519-527.
- Patel V, Senderowicz AM, Pinto D Jr, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind JS. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent

- kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; 102(9):1674-81.
- Petreaea ML, Yao M, Liu Y, DeFea K, Martins-Green M. Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 by Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) Is Required for IL-8/CXCL8-induced Endothelial Permeability *Mol Biol Cell* 2007; 18: 5014–23.
- Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.* WHO. 2ND Ed. Springer. Berlin: 1997.
- Podolin PL, Bolognese BJ, Foley JJ et al. A Potent and Selective Nonpeptide Antagonist of CXCR2 Inhibits Acute and Chronic Models of Arthritis in the Rabbit *J Immunol* 2002; 169: 6435–44.
- Rambeaud M, Pighetti GM. Differential calcium signaling in dairy cows with specific CXCR1 genotypes potentially related to interleukin-8 receptor functionality. *Immunogenetics* 2007; 59:53–58.
- Ramjeesingh R, Leung R, Siu CH. Interleukin-8 secreted by endothelial cells Induces chemotaxis of melanoma cells through the chemokine receptor CXCR1. *FASEB express article* 10.1096/fj.02-0560fje. Published online May 8, 2003.
- Rapaport A, Kowalski LP, Herter NT, Brandão LG, Walder F. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do câncer de boca. *Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço - Projeto Diretrizes - maio, 2001.*
- Reiland J, Furcht LT, McCarthy JB. CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate.* 1999; 41(2):78-88.
- Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/ chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22; 175–86.
- Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006; 42: 760–7.
- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 2004;25(4):201-9.
- Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 2004; 112: 481–95.
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:217–42.
- Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, Chaisri U. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009; 14 (7):319-24.
- Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5):394-401.
- Shibata F, Konishi K, Nakagawa H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) *Cytokine* 2000; 12 (9): 1368–73.

- Silverman S, Eversole, LR, Truelove, EL. *Fundamentos de Medicina Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res*. 1996; 2(12):1999-2006.
- Sitorus RS, Gumay S, van der Valk P. The apoptotic paradox in retinoblastoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1171:77-86.
- Slettenaar VIF, Wilson JL. The chemokine network: A target in cancer biology? *Adv Drug Delivery Rev* 2006; 58:962-74.
- Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:195-200.
- Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2005; 16:593-609.
- Strieter, Burdicka MD, Mestasa J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 768-78.
- Suzuki H et al. Rat CXC chemokine GRO/CINC-1 paradoxically stimulates the growth of gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000; 14 Suppl 1:94-100.
- Tse GM, Chan AWH, Yu KH, King AD, Wong KT, Chen GG, Tsang RKY, Chan, ABW. Strong Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Predicts Overall Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(12):3558-3565,
- Tsuji T, Noguchi M, Kido Y, Kubota H, Takemura K, Nakamori K, Hiratsuka H. Predictive assay of neoadjuvant chemotherapy in management of oral cancer. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2007; 36: 15-19.
- Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S, Inokuchi T. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2004; 40(3):321-5.
- Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:201-208.
- Vanderbilt JN, Mager EM, Allen L, et al.: CXC Chemokines and Receptor in Type II Cells and Upregulated following Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 29(6):661-8.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 2008; 267(2):226-44.
- Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125(2):209-16.
- Wang HM, Liao CT, Chang TC, Chen JS, Liaw CC, Chen IH, Tsang NM. Biweekly paclitaxel, cisplatin, tegafur, and leucovorin as neoadjuvant chemotherapy for unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2004; 101(8):1818-23.

- Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res* 2006; 66(6):3071-7.
- Wang B, Khachigian LM, Esau L, Birrer MJ, Zhao X, Parker MI, Hendricks DT. A Key Role for Early Growth Response-1 and Nuclear Factor- κ B in Mediating and Maintaining GRO/CXCR2 Proliferative Signaling in Esophageal Cancer *Mol Cancer Res* 2009; 7(5):755–64 (a).
- Wang F, Arun P, Friedman J, Chen Z Van Waes C. Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2009, 9:389–395 (b).
- Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2002; 38: 670–679.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(21):6735-41.
- Wente MN, Keane MP, Burdick MD, Friess H, Büchler MW, Ceyhan GO, Reber HA, Strieter RM, Hines OJ. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis. *Cancer Lett*. 2006; 241(2):221-7.
- White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* 1998; 273(17):10095–8.
- White FA, Bhangoo SK, Miller RJ. Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nature* 2005; 4:834-844.
- WHO – World Health Organization Classification of Tumours -Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: 2005.
- Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(2):113-20.
- Wislez M, Fujimoto N, Izzo JG, Hanna AE, Cody DD, Langley RR, Tang H, Burdick MD, Sato M, Minna JD, Mao L, Wistuba I, Strieter RM, Kurie JM. High expression of ligands for chemokine receptor CXCR2 in alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic kras. *Cancer Res* 2006; 66(8):4198-207.
- Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42(6):793-802.
- Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD, Bekele BN, Fidler IJ, Myers JN. Tumor Cell and Endothelial Cell Therapy of Oral Cancer by Dual Tyrosine Kinase Receptor Blockade. *Cancer Res* 2004; 64: 7977–84.
- Zehnder M, Greenspan JS, Greenspan D, Bickel M. Chemokine gene expression in human oral mucosa. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 231-235.
- Zhang HY, Meng X, Du ZX, Fang CQ, Liu GL, Wang HQ, Deng WW. Significance of survivin, caspase-3, and VEGF expression in thyroid carcinoma. *Clin Exp Med* 2009; 9:207–213.
- Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *British J Cancer* 2004; 91:1970 – 1976.

Zima A; Carlos R, Gandhi D, Case I, Teknos T, Mukherji SK. Can Pretreatment CT Perfusion Predict Response of Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract Treated with Induction Chemotherapy? *Am J Neuroradiol* 2007; 28:328–34.