

Introdução

As neoplasias da cavidade oral são responsáveis por 7% dos novos casos de doença oncológica em todo o mundo, com cerca de 270 000 novos casos anuais ¹. Em países considerados desenvolvidos, este tipo de neoplasias apresentam-se como a quinta mais comum nos homens e a sétima mais comum nas mulheres ¹. Têm sido avançados diversos factores para explicar as suas altas taxas de incidência, sendo o álcool e o tabaco reconhecidos por vários autores como factores de risco primários para as neoplasias da cavidade oral ^{1,2,3,6,7,8}. A par destes, têm sido também descritos factores nutricionais, genéticos e ocupacionais ^{1,2,3}. A má higiene da cavidade oral é apontada como factor de risco segundo alguns autores ^{1,2,3,5}.

Mais de 80% das neoplasias da cavidade oral diagnosticadas nos EUA e na Europa têm origem em hábitos tabágicos e alcoólicos marcados ^{2,4,5}. Aliás, de acordo com a esmagadora maioria da literatura, hoje o tabaco representa por si só a maior causa de doença e morte que poderia ser prevenida ⁴.

O tratamento das neoplasias da cavidade oral passa geralmente pela cirurgia radical ⁸. Em estadios mais avançados da doença são usadas altas doses de radioterapia para eliminar eventuais focos oncológicos residuais ⁸. Ainda assim, os doentes com tumores de grande tamanho e alto potencial metastático têm taxas de sobrevivência de 30% aos 5 anos, enquanto os doentes com tumores menos agressivos apresentam taxas que variam dos 80 aos 90% no mesmo período ⁸.

É fundamental que os clínicos que lidam com estas patologias sejam dotados de um alto grau de experiência clínica, essencial para um correcto diagnóstico ⁸. O uso de análises sanguíneas para detecção e despistagem de marcadores oncológicos é apontado como uma área de sobeja importância na oncologia, ao permitir diagnósticos precoces de patologias que, de outra forma, teriam um percurso extremamente doloroso e nefasto para os doentes ⁸.

Por outro lado, têm sido realizados vários estudos sobre os efeitos carcinogénicos e sobre a própria via de oncogénese do tabaco, enquanto os seus efeitos não-carcinogénicos – moleculares, tóxicos, hormonais – têm sido pouco valorizados, embora estes também possam influenciar a via oncogénica.

O uso de bio-marcadores tem, assim, sido objecto de investigação na oncogénese experimental como parte crítica na resolução de um dos problemas de saúde humana mais complexos. O presente trabalho tem como objectivo a revisão bibliográfica sobre os vários métodos moleculares aplicados actualmente para a descoberta de bio-marcadores, como sejam a genómica, a proteómica, a metabolómica e a imunohistoquímica, com particular interesse nos efeitos moleculares, uma vez que estes precedem os efeitos histo-morfológicos ditos carcinogénicos, sobre os quais muita investigação tem sido feita ao longo dos anos e que não terá, como tal, interesse neste trabalho em particular. Este trabalho de mestrado conta ainda com uma contribuição pessoal, onde o autor apresenta um modelo experimental sobre o perfil metabólico dos músculos mastigadores normais para posteriores estudos de alterações decorrentes da administração experimental de um carcinógeno.

Aspectos morfo-funcionais dos músculos mastigadores

Histofisiologia do músculo esquelético

As células musculares esqueléticas (ou células estriadas), tal como as células musculares cardíacas e as células musculares lisas, ou células do movimento involuntário, pertencem ao grupo das células contrácteis ⁹. Estas células são adaptadas especialmente para a geração de forças contrácteis por interacção das cadeias de proteínas actina e miosina ⁹. Dentro deste grande grupo de células contrácteis temos, além das células musculares, as células mio-epiteliais, os mio-fibroblastos e os perícitos ⁹. Os perícitos são células lisas, que partilham semelhanças com as células musculares e são encontradas ao redor de vasos sanguíneos. As células mio-epiteliais são uma componente importante de certas glândulas excretoras ⁹.

As células musculares esqueléticas formam a base estrutural dos músculos ⁹. Estes músculos possuem movimentação voluntária controlada pelo sistema nervoso central e participam na manutenção da postura corporal ⁹.

As células do músculo esquelético são multinucleadas, resultado da união e fusão dos mioblastos. Os núcleos deslocam-se para a periferia das células, podendo mesmo estar na proximidade da membrana citoplasmática ^{9,11}. As células do músculo esquelético são longas e finas, de forma cilíndrica, com um diâmetro de aproximadamente 50 a 60 µm em adultos, atingindo comprimentos até 10 cm, dependendo da sua localização ^{9,11}. Durante a diferenciação dos mioblastos há uma grande expressão das proteínas actina e miosina, que ficam alinhadas em sarcómeros. Os sarcómeros são colocados topo-a-topo e alinhados em perfeição para formarem a unidade estrutural celular – as miofibrilhas ¹¹. Centenas de miofibrilhas vão assim ocupar a quase totalidade do sarcoplasma das células musculares ¹¹.

Organização do músculo esquelético

Num músculo volumoso, como sejam por exemplo o músculo deltóide ou o masseter, as fibras musculares estão organizadas em grupos de feixes, sendo este conjunto de feixes envolvido por uma membrana de tecido conjuntivo designada de epimísio ¹². Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo que se dirigem para o interior do músculo, separando os feixes. Estes septos são designados de perimísio, envolvendo pequenos grupos de feixes musculares ¹². Cada fibra muscular, individualmente, é envolvida pelo endomísio, que é formado pela lâmina basal da fibra muscular, associado a fibras reticulares. O endomísio apresenta escassa população celular, sendo constituído na sua grande maioria por fibroblastos ¹². Todas estas membranas de tecido conjuntivo têm como objectivo final a perfeita união entre todas as fibras musculares, permitindo que a força de contracção gerada por cada uma actue sobre todo o músculo. Este tecido conjuntivo tem um papel funcional importante, já que muitas vezes estas fibras musculares não se estendem de uma extremidade à outra do músculo ¹². É ainda por intermédio do tecido conjuntivo que as forças da contracção muscular são transmitidas a outras estruturas, como os tendões e ossos.

Também as fibras musculares apresentam uma estrutura complexa. Quando observadas ao microscópio óptico mostram estriações transversais, pela alternância de feixes claros e escuros ¹². Estas foram classificadas após observação por microscópio de polarização, onde se observou uma banda escura que possuía anisotropia, daí recebendo o nome de banda A, enquanto a faixa clara era isotrópica, pelo que é designada banda I ¹². No centro de cada banda I nota-se uma linha transversal escura – banda Z ¹². Estas estriações transversais ocorrem pela repetição das unidades sarcoméricas. Cada

sarcómero mede cerca de 2,5 μm e é formado pela parte da miofibrilha que fica entre as duas linhas Z sucessivas, contendo uma banda A a separar as duas semi-bandas I ¹². As miofibrilhas possuem um diâmetro de 1 a 2 μm , são paralelas ao eixo maior da fibra muscular e consistem num arranjo perfeito e repetitivo de sarcómeros ¹².

À microscopia electrónica de varrimento, as miofibrilhas revelam a presença de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, dispostos longitudinalmente e organizados numa distribuição simétrica e paralela ¹². Esta organização é mantida por várias proteínas, como por exemplo os filamentos intermediários de desminas, que ligam as miofibrilhas umas às outras. Para além das proteínas actina e miosina, as miofibrilhas do músculo esquelético possuem ainda as tropomiosinas, proteínas com cerca de 40 nm de comprimento que se unem umas às outras pelas extremidades para formar filamentos localizados ao longo do sulco existente entre dois filamentos de actina ¹². As miofibrilhas possuem ainda a troponina, um complexo de três sub-unidades proteicas: o TnT, que se liga fortemente à tropomiosina; o TnC, que permite a ligação com os iões cálcio; e o TnI, que cobre o local activo da actina, onde ocorrem as interacções entre a actina e a miosina ¹². Cada molécula de tropomiosina possui um local específico para a ligação deste complexo de troponina. É a partir deste local activo na troponina que a actina interage com a miosina e permite os movimentos musculares, com contracções vigorosas ¹².

Existem dois tipos de fibras musculares esqueléticas – as fibras de contracção lenta (Fibras S ou tipo I) e as fibras de contracção rápida (Fibras F ou tipo II). A cada unidade motora está associada apenas um destes tipos de fibras ^{13,47}. As fibras de contracção lenta são menos susceptíveis à fadiga, estando assim preparadas para performances prolongadas ^{13,47}. São fibras intensamente irrigadas por capilares sanguíneos e com uma grande densidade de mitocôndrias, possuindo armazenadas grandes quantidades de energia na forma de lípidos e tendo ainda a mioglobina, que permite o armazenamento de oxigénio de curta duração ^{13,47}. As fibras de contracção rápida são responsáveis por contracções musculares extremamente rápidas e breves; sofrem de fadiga rapidamente, possuem grandes quantidades de glicogénio mas pequenas quantidades de mioglobina ^{13,47,85}.

A contracção muscular depende da disponibilidade de iões Ca^{2+} , havendo relaxamento muscular quando a concentração deste ião diminui no sarcoplasma. O retículo sarcoplasmático armazena e regula o fluxo destes iões ¹². Quando a membrana do retículo sarcoplasmático é despolarizada por estímulos nervosos, há abertura dos canais de cálcio e estes saem por difusão passiva, actuando sobre uma das sub-unidades da troponina e permitindo a formação de pontes entre a actina e a miosina. Quando cessa a

despolarização, a membrana do retículo sarcoplasmático, por processos activos consumidores de energia, transfere Ca^{2+} para o interior das suas cisternas e interrompe a actividade contráctil ¹².

O músculo esquelético é o único tipo muscular que possui placas terminais motoras ¹³. A transmissão de estímulos de um axónio motor para uma fibra muscular ocorre através destas interfaces mediante uma sinapse química. O neurotransmissor envolvido é a acetilcolina, que se liga aos N-colinoreceptores ¹³. Ao contrário da maioria dos receptores sinápticos, estes não são mediados primariamente por transferência iónica, e muito embora ocorram fenómenos de despolarização, estes não são determinantes; ao invés, a probabilidade de abertura destes receptores aumenta consoante a concentração de acetilcolina presente na fenda sináptica ¹³. Isto é confirmado pela própria cessação da transmissão sináptica que ocorre por dois factores: o primeiro é a degradação rápida da acetilcolina por uma acetilcolinesterase e o segundo é a difusão de acetilcolina para fora da fenda sináptica ¹³.

Métodos de avaliação molecular dos músculos mastigadores

Genómica

A publicação do genoma humano marcou uma mudança na investigação científica, que alguns autores descrevem como a época pós-genómica ^{9,35,48}. A sequência do genoma humano tem aproximadamente 30000 a 40000 genes ⁹. Todas as células do mesmo indivíduo têm o mesmo genoma, enquanto diferentes indivíduos da mesma espécie têm um genoma 99,9% idêntico ⁹. Esta diferença de 0,01% pode parecer de menor importância, mas não o é de facto; são nestes 0,01% de variabilidade genética que enquadrámos os polimorfismos genéticos, envolvidos frequentemente na manifestação genética diferenciada de variadas patologias ⁹.

A utilização de técnicas de ordenamento automático do DNA, que permitem a clonagem de fragmentos de DNA na ordem dos 100 kb de comprimento e a utilização de algoritmos informáticos para organizar toda esta informação, permitiu a descoberta do património genético humano e também de algumas espécies chave na experimentação animal ³⁰.

Para a expressão genética ocorrer, há a formação de RNAm transcrito a partir do DNA obtido de células do indivíduo, para que a partir deste ocorra a formação de uma determinada cadeia proteica ⁹. Uma vez que o RNAm é uma cópia exacta da região correspondente do DNA, este pode ser analisado para avaliar a expressão génica daquele indivíduo, ampliando assim os conhecimentos sobre patologias moduladas por factores genéticos ⁹.

Os microarrays de DNA revolucionaram a maneira de analisar os genes, através da monitorização simultânea dos produtos de RNA de milhares de genes ^{31,32,33,34,35,40,43,48}. Os microarrays de DNA são lâminas de vidro crivadas com um grande número de fragmentos de DNA, cada um contendo uma sequência de nucleótidos que irá servir como "sonda" para um gene específico ^{31,32,34,35,39,41,48,46}. Para a utilização dos microarrays de DNA, o RNAm das células-alvo do estudo é extraído e copiado sobre a forma de DNA complementar, ou DNAc. O DNAc é mais fácil de manipular do que o RNAm, sendo marcado com uma sonda fluorescente. Este microarray é incubado com a amostra de DNAc marcada e hibridizada. O microarray é depois lavado para remover eventuais moléculas não-ligadas e as posições nas quais os fragmentos de DNA marcados hibridizaram são identificados com pontos fluorescentes, por um microscópio automatizado de varrimento a LASER ^{31,34,35,39,41,43}. As posições neste array são comparadas com os genes, podendo recorrer-se à utilização de software informático específico, correspondendo cada uma das marcações a um gene em particular ^{31,34,41,42,43}.

Têm sido conduzidos inúmeros ensaios nos últimos anos com recurso à utilização de microarrays de DNA, averiguando a sua importância de um ponto de vista clínico ^{10,34,35,36,39,47}. De facto, tem sido publicada uma quantidade enorme de informação, sendo necessário distinguir aquela que verdadeiramente interessa ao investigador ^{10,37,40}.

O fenótipo de um qualquer organismo é estabelecido de acordo com a expressão de vários genes. Uma vez que os microarrays de DNA analisam o RNAm, e estes, por sua vez, dão indicação dos genes activos, estes fornecem ao investigador um perfil de expressão génica ^{10,40}. A identificação destes genes activos tem o potencial de identificar vias metabólicas e mecanismos patogénicos, identificar bio-marcadores e novos alvos terapêuticos ^{10,37,39}. Aplicando esta tecnologia num indivíduo apenas, poderemos identificar determinado perfil de expressão génica que seja compatível com alguma doença ou quadro patológico conhecido. De facto, os perfis de expressão génica da leucemia aguda, do melanoma e do cancro da mama têm sido identificados e usados para, de alguma forma, classificar a gravidade destas patologias ^{10,38,44,45}.

Tem havido indicações para o seu uso na investigação experimental da oncogénese oral¹⁰. O desenvolvimento das neoplasias orais implica dano genético progressivo, perda de heterogeneidade e a inactivação de genes supressores de neoplasias¹⁰. Por outro lado, e por muito que pareça que as margens de tumores excisados pareçam histologicamente normais, existe evidência crescente que o dano genético pode ser mais extenso do que se verifica à microscopia, hipótese que explica alguns casos de recorrência¹⁰. Assim, os microarrays de DNA poderão ser usados para avaliar o grau de dano genético tanto no tumor como no tecido adjacente, podendo acrescentar informações valiosas nos campos do tratamento e prognóstico^{10,36,44}.

Proteómica

Numa era pós-genómica, a proteómica assumiu-se como a próxima “-ómica” a ser investigada^{65,66}. A proteómica é o equivalente proteico à genómica, englobando um vasto conjunto de tecnologias viradas para a determinação da identidade e qualidade de proteínas expressas em diferentes células, bem como a sua estrutura tri-dimensional e interacções⁶⁵. Este campo da ciência tem tido bastante expressão na área da oncologia, nomeadamente na descoberta de grupos proteicos envolvidos na oncogénese, bem como na descoberta de bio-marcadores para o diagnóstico, prognóstico e detecção de recorrência^{65,66}.

A proteómica define-se como o estudo de todas as proteínas produzidas pelas células ou por micro-organismos, envolvendo a identificação e quantificação das proteínas presentes no corpo e a determinação do seu papel em funções fisiológicas e fisiopatológicas^{65,66,69,72}. O proteoma define-se assim como todo o conjunto proteico presente numa determinada célula ou micro-organismo^{65,66,69,72}.

Uma vez que são proteínas que estão directamente envolvidas nos processos celulares e bioquímicos fisiológicos e fisiopatológicos, é lógico assumir que do seu estudo advirá um maior conhecimento dos processos patológicos⁶⁵. Por outro lado, o genoma celular permanece relativamente inalterado ao longo do tempo, ao passo que o proteoma sofre inúmeras alterações, dependendo, em parte, da activação e desactivação de determinados genes celulares e a sua transcrição⁶⁵. Aliás, face a esta mesma natureza dinâmica, alguns investigadores usaram o termo proteómica funcional para descrever o conjunto proteico de uma célula num determinado espaço de tempo⁶⁵. Se pensarmos

que o genoma é constituído por aproximadamente 30 000 genes que codificam aproximadamente 40 000 proteínas, e que mecanismos como o *splicing* alternativo do RNA e modificações pós-transcricionais irão elevar este número até 2 000 000 diferentes proteínas e fragmentos proteicos, vemos claramente que o proteoma é mais complexo que o genoma humano ⁶⁵.

No passado, o estudo das proteínas e a sua associação com várias doenças apresentava inúmeras limitações; em particular, os métodos imunológicos aplicados requeriam anticorpos específicos para identificar péptidos e antigénios, o que resultava na obtenção de poucos dados ⁶⁶.

A electoforese bi-dimENSIONAL em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido usada há décadas para a separação de proteínas de acordo com a sua massa e carga ^{65,66,70}. As proteínas são separadas pela sua carga – pontos isoeléctricos – numa dimensão, e pela sua massa molecular na segunda dimensão ^{65,66}. Contudo, este método é laborioso e requer muito tempo; por outro lado, possui um baixo alcance proteico e variabilidade entre os diferentes géis usados ^{65,66}. Hoje, a 2D-PAGE é usada em combinação com a espectroscopia de massa (MS) ou com a cromatografia líquida (LC), pelo que a proteómica contemporânea apresenta cada vez mais dados científicos promissores ^{65,66,68}. Estes instrumentos/técnicas não só facilitam a separação e identificação das proteínas, como também fornecem informação acerca das redes proteicas ^{65,66,68}.

O primeiro passo para a análise do perfil proteico é a separação das proteínas, podendo esta ser feita por um método selectivo ou não-selectivo. Os métodos selectivos têm como objectivo identificar uma única proteína da amostra com propriedades específicas, sendo semelhante às técnicas de purificação de proteínas ⁶⁶. Os métodos não-selectivos, por sua vez, fraccionam misturas complexas antes da sua análise ⁶⁶. Após esta primeira fase de separação de uma mistura complexa de proteínas em componentes individuais, o próximo passo será a sua identificação. Actualmente, o método de eleição para a análise proteica é a espectroscopia de massa ^{66,68}.

No passado, a identificação proteica estava limitada pelo seu elevado custo, pouca obtenção de dados e resultados finais pouco satisfatórios ⁶⁶. Por exemplo, o *Western blotting* e a imunohistoquímica são técnicas comuns e fidedignas utilizadas para confirmar a presença de proteínas específicas. No entanto, apenas uma proteína pode ser detectada de cada vez, sem falar na necessidade de um anticorpo específico para a proteína em questão ⁶⁶. A aplicação da MS na proteómica permite a identificação directa e simultânea de um grande número de proteínas, pelo que se tornou no método de

eleição de separação destas ^{66,67,68}. Depois de se obter o proteoma é necessário analisar e fazer correspondência das proteínas pesquisadas com a informação presente nas bases de dados ^{66,68}.

O termo oncoproteómica tem sido usado para descrever a aplicação da proteómica na oncologia ⁶⁶. O estudo proteico na oncologia tem permitido a investigação da expressão proteica e de interações de complicados processos de sinalização ⁶⁶. Novos fármacos anti-tumorais, tais como a trastuzumab (Herceptin®) demonstram grande eficácia no tratamento de grupos selectivos de doentes com cancro, sendo estes fármacos proteínas usadas especificamente para interagirem com outras proteínas envolvidas no processo de oncogénese ⁶⁶. A proteómica tem sido usada na investigação das neoplasias da próstata, do ovário, do pâncreas, da mama e colo-rectal ^{66,71}.

Os objectivos finais da proteómica vão além da simples catalogação das proteínas que as células expressam quer no seu estado de saúde, quer no seu estado de doença ⁶⁸. O objectivo eventual é elucidar a organização e a dinâmica das redes metabólicas, das cascatas sinalizadoras e reguladoras através das quais a vida da célula se processa ⁶⁸. Ainda mais, a proteómica procura compreender como essas redes são influenciadas por processos patológicos e prever como a sua função pode ser manipulada através de novos fármacos e terapia génica ⁶⁸.

Metabolómica

A metabolómica é das últimas técnicas da genómica funcional a ser descrita e usada ⁴⁹. Embora recente, esta técnica mostra-se bastante promissora no campo da pesquisa oncológica ^{49,52}, podendo levar à descoberta de bio-marcadores metabólicos para a detecção precoce, estadiamento e prognóstico do cancro ^{49,52}. Pode ainda fornecer bio-marcadores metabólicos para avaliar a resposta de um determinado agente anti-neoplásico e à previsibilidade associada ao seu uso, bem como eventuais efeitos tóxicos adversos no doente ^{49,52}. Neste sentido, a análise dos fluidos humanos, como sejam o sangue e a urina, podem ser facilmente obtidos e analisados, uma vez que o metaboloma dos fluidos reflecte exactamente a resposta do organismo a um determinado processo oncológico ou à sua terapêutica ^{49,52}. Noutra perspectiva mais académica e de investigação, a metabolómica pode ainda ser usada para a sinalização e descoberta de

novas vias oncogénicas. Com este objectivo são analisadas células tumorais provenientes de biópsias obtidas por métodos cirúrgicos idênticos aos que são usados na obtenção de biópsias para exames histo-patológicos ^{49,52}.

A análise metabolómica, de uma forma geral, consiste na identificação do maior conjunto de metabolitos possíveis presentes no tecido-teste, na sua quantificação e comparação com as amostras de tecidos controlo disponíveis em bases de dados ^{49,50,51,52,53,60}. Dedicar-se ao estudo da sua composição, dinâmica, interacções e respostas a mudanças ambientais nas células, tecidos e bio-fluidos ⁵⁴. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) tem sido a ferramenta de eleição para a análise metabolómica ⁴⁹. A espectroscopia de NMR por protão uni-dimensional tem a si associadas altas taxas de sensibilidade e de quantificação de metabolitos, aproveitando em parte mecanismos de processamento de dados semi-automáticos ⁴⁹. A espectroscopia de NMR bi-dimensional foi recentemente introduzida, tendo como vantagens uma maior especificidade para a detecção metabólica e aperfeiçoamento da resolução de superimposições unidimensionais do espectro obtido, mantendo ao mesmo tempo uma boa sensibilidade, especialmente em associação com os cilindros de alta resolução, tais como as usadas no *magic angle spinning samples* (HRMAS) ^{49,50,53,59}. Isto torna possível a detecção individualizada de até 20 a 40 metabolitos nas amostras ⁴⁹.

O metaboloma foi definido como sendo toda a colecção de moléculas, do ponto de vista quantitativo e qualitativo, de baixo peso molecular que se encontram presentes numa determinada célula e que são fundamentais para os seus mecanismos de manutenção, crescimento e desenvolvimento normal ^{50,51}. O tamanho do metaboloma varia grandemente de acordo com o organismo a estudar; o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* tem aproximadamente 600 metabolitos, enquanto o reino das plantas possui aproximadamente 200 000 metabolitos primários e secundários ^{50,59}. Pensa-se que o metaboloma humano poderá ser muito maior do que tudo o que até agora tem sido descrito ^{50,59}. Esta grande variabilidade é explicada pela grande diversidade de fórmulas químicas dos metabolitos, mas também pelas suas variações químicas (peso molecular, polaridade e solubilidade) bem como variações físicas (volatilidade) ⁵⁰. A metabolómica tem hoje várias indicações, entre elas: a determinação de bio-marcadores na doença ou em resposta a terapêuticas medicamentosas; avaliação do efeito bioquímico ou stress ambiental sobre plantas e micro-organismos, o que inclui plantas geneticamente modificadas; a caracterização bacteriana; a avaliação da saúde humana; e a engenharia metabólica ^{50,51,55,56,58,59,61}.

A espectroscopia de massa (MS) e a NMR são as principais plataformas tecnológicas utilizadas para determinar o perfil metabólico, ambas com vantagens e desvantagens. A maior vantagem na utilização da espectrometria de massa é a sua sensibilidade. Quando combinada com a cromatografia líquida (LC), a MS consegue facilmente detectar centenas de espécies individuais numa única amostra clínica ^{50,52,57,58,59,63,64}.

A MS tem sido a tecnologia mais usada na análise metabólica, uma vez que fornece uma análise quantitativa e qualitativa selectiva, rápida e com boas taxas de sensibilidade ^{50,61}. Os espectrómetros de massa operam por formação iónica e separação destes de acordo com a sua relação massa e carga e posterior detecção dos iões separados ^{50,56,58}. Contudo, os metabolitos não fornecem o complexo modelo de fragmentação que os péptidos fornecem, tornando a sua identificação mais difícil. A sua quantificação que é crítica para o reconhecimento de potenciais bio-marcadores é uma das falhas desta técnica. Existem diversos factores que influenciam a intensidade do sinal de um composto na MS, incluindo a composição da mistura (como por exemplo o seu ambiente molecular) ⁵².

Para maximizar a cobertura metabólica, a MS recorre à cromatografia líquida (LS) para separar os metabolitos antes da análise, podendo detectar facilmente centenas de espécies individuais com apenas uma amostra; contudo, cada amostra necessita de várias horas para ser analisada ^{52,60}.

A espectroscopia por NMR constitui um método rápido, não destrutivo, que permite grande obtenção de informações e preparação mínima da amostra ^{50,51,55,60,62}. Esta técnica tira vantagem das propriedades rotacionais dos núcleos dos átomos ⁵⁰. A espectroscopia por NMR funciona através da aplicação de fortes campos magnéticos e frequências rádio aos núcleos dos átomos. Para os átomos que possuem um número atómico ímpar ou número de massa molecular ímpar, a presença de um campo magnético irá causar a rotação do núcleo destes, denominada esta de rotação nuclear ⁵⁰. A absorção da energia das frequências rádio vai fazer com que o núcleo do átomo passe de uma baixa rotação para uma alta rotação, e é detectada a consequente emissão de radiação durante o processo de relaxamento ⁵⁰.

A análise do espectro obtido por NMR pode ser extremamente difícil, face à imensidão de sinais sobrepostos e multiplicidade destes ⁵¹. O espectro do NMR para uma molécula particular é único, pelo que o NMR tem sido considerado um dos métodos mais selectivos, se não o mais selectivo, na análise metabólica ⁵¹. Para a análise deste espectro, devemos ter em conta o número, as posições e as áreas dos sinais obtidos,

bem como a multiplicidade dos mesmos ⁵¹. Para a interpretação deste espectro têm sido desenvolvidos softwares informáticos que facilitam grandemente a sua análise e compreensão ⁵¹.

A espectroscopia por NMR apresenta como vantagens principais a sua reprodutibilidade, a sua capacidade na quantificação de compostos e a sua capacidade de identificar metabolitos desconhecidos. Outra característica da NMR, por vezes sub-aproveitada, é a sua versatilidade na análise metabólica de fluidos no estado líquido, em tecidos intactos ou mesmo *in vivo*. No entanto, apresenta como sua limitação relativa a sensibilidade, que muito embora tenha sido ampliada com avanços tecnológicos recentes, permanece inferior à sensibilidade associada à MS ^{52,55,60,61,64}.

De notar que o controlo das amostras a analisar deve ser rigoroso, uma vez que pequenas mudanças na temperatura, pH e a presença de impurezas ou a degradação da amostra pode levar à detecção de alterações metabólicas falsas, bem como indicar diferentes metabolitos ^{50,51,60}.

Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica é utilizada para localizar proteínas num determinado tecido, sendo que se visar a análise de uma célula ou de uma população de células designa-se imunocitoquímica. Tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos, geralmente IgG's mas também IgM's, contra a proteína que se pretende identificar e localizar nesse tecido ^{73,74,77}. Assim, esta proteína funciona como um antigénio ⁷³. Existem vários anticorpos disponíveis comercialmente, de acordo com o tipo de proteína a identificar e a espécie animal usada no ensaio. Para a síntese de novos anticorpos, é necessária a imunização de animais contra a proteína/antigénio, injectando-a na corrente sanguínea (numa abordagem semelhante à vacinação). Posteriormente recolhe-se o sangue dos animais imunizados e purificam-se os anticorpos. Neste caso, são purificados todos os anticorpos contra esse tipo de antigénio – ou seja, anticorpos que se ligam em diferentes regiões da proteína. Sendo assim anticorpos diferentes, designamo-los por anticorpos policlonais ⁷³. Existem outro tipo de anticorpos, os anticorpos monoclonais, que são anticorpos mais específicos que os policlonais, uma vez que se ligam única e exclusivamente a uma só região da proteína

alvo. Isto elimina erros oriundos do uso dos policlonais, uma vez que, ligando a diversas regiões, podem também reconhecer outras proteínas com regiões semelhantes e dar origem a sinais inespecíficos ⁷³. Clinicamente é uma técnica coadjuvante, que não substitui o diagnóstico histológico tradicional ⁷⁴.

O anticorpo, mono ou policlonal, não tem qualquer marcação que permita a sua visualização e identificação (salvo o caso do anticorpo anti-anexina V) ⁷³. Usa-se, assim, um segundo anticorpo, designado de anticorpo secundário, que se vai ligar ao primeiro anticorpo, designado de anticorpo primário ⁷³. Estes anticorpos secundários podem estar marcados de diferentes maneiras: radioactividade ou por diferentes tipos de fluorescência, dependendo assim também o método de detecção utilizado ⁷³.

Esta representa uma ferramenta importante e poderosa na identificação e localização de uma ampla variedade de antigénios em cortes de parafina, tecidos congelados e preparações celulares ^{75,77,78}. Se por um lado este método permite a detecção de depósitos tecidulares anormais, por outro permite a determinação do imunofenótipo das células normais e das suas homólogas neoplásicas ⁷⁵. A imunohistoquímica tem sido útil na determinação da linhagem de células tumorais, da sua propagação e metástases, bem como de factores prognósticos ⁷⁵. Desta forma, a imunohistoquímica pode fornecer importantes dados que modulem a terapêutica em muitas doenças ⁷⁵.

O diagnóstico imunohistoquímico em processos oncológicos baseia-se no princípio de que células neoplásicas retêm algum tipo de semelhança imunofenotípica com os tecidos normais circundantes, que estas tentam mimetizar ⁷⁴. Por outro lado, sabe-se, por vários estudos clínico-patológicos publicados, que a expressão de um antigene ou de um grupo determinado de antigenes está directamente relacionado com diferentes tipos de processos neoplásicos, que se encontram devidamente catalogados ⁷⁴.

Todas as técnicas de imunohistoquímica representam métodos muito sensíveis e específicos, havendo indicações até para a automatização de alguns procedimentos ^{75,76,78,79}. Os dois tipos de técnicas que são mais utilizadas são a imunofluorescência directa – que permite a visualização de imunocomplexos e depósitos em tecidos congelados – e o método da avidina-biotina – que permite a detecção de antigénios celulares em cortes de parafina, tecidos congelados e esfregaços de células ⁷⁵.

A imunofluorescência directa é uma técnica rápida que consiste na aplicação de um anticorpo fluorescente num corte histológico, que se deixa incubar durante 30 minutos. Posteriormente, lava-se e observa-se ao microscópio de luz UV. Todos os anticorpos que se ligaram ao antígeno específico vão aparecer como áreas verdes fluorescentes ⁷⁵.

O método da avidina-biotina permite a obtenção de alta sensibilidade no procedimento ⁷⁵. Este processo requer a ligação de um anticorpo primário ao antígeno em questão, onde posteriormente se aplica o sistema indirecto de avidina-biotina associado a um produto enzimático que permite a sua visualização ao microscópio ⁷⁵.

A imunohistoquímica é muito usada para efeitos de diagnóstico e prognóstico, sendo naturalmente importante a sua padronização para resultados fiáveis e reproduzíveis ⁷⁸. A imunohistoquímica pode ser afectada por factores pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, resultando em níveis baixos de reprodutibilidade, com consistência variável e variabilidades inter-laboratoriais ⁷⁸. Apesar de terem havido grandes dificuldades, foram feitos esforços no sentido de padronizar o diagnóstico imunohistoquímico, tendo havido várias sugestões e sido elaboradas *guidelines* com procedimentos passo-a-passo dos processos de fixação, processamento e análise ⁷⁸.

Embora a introdução de reagentes mais sensíveis e sistemas de detecção sofisticados associados a processos de automação tenham aumentado consideravelmente a reprodutibilidade e consistência das técnicas imunohistoquímicas, a padronização destas permanece ainda hoje um desafio por cumprir ⁷⁸. Como tal, a aplicação criteriosa de protocolos estandardizados e específicos para determinada técnica deverá ser cumprida, indo isto assegurar resultados fiáveis e sólidos e ampliar a utilidade clínica da imunohistoquímica ^{78,80}.

Modelos de oncologia experimental

A oncogénese experimental é um campo de estudo bastante activo, com diversos trabalhos publicados. A oncogénese oral, especificamente, tem também sido alvo de variadas equipas de investigadores, com diferentes modelos experimentais publicados ^{15,16,17,18,26}.

Para a indução experimental de neoplasias, têm sido usados diversos agentes carcinogénicos como o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e a 1,2-dimetilhidrazina (DMH), isolados ou em conjunto com outros agentes, como o etanol e pesticidas.

O DMBA pode ser utilizado segundo vários protocolos de administração. Para a indução de neoplasias orais, está referenciada a aplicação tópica, com um pincel, de 0,5% de DMBA dissolvido em 100µl de óleo mineral directamente nas bolsas jugais de hamsters ¹⁵. Pretendia-se assim avaliar os efeitos a curto e a médio prazo de um novo fármaco anti-neoplásico, modulando as aplicações de DMBA a três meses e a seis meses, respectivamente. A substância-teste (GW2974) apresenta-se como um inibidor duplo das tirosinas cinases de EGFR e de ErbB2. Os autores obtiveram resultados positivos, concluindo que este inibidor previne a oncogénese oral neste modelo experimental específico ¹⁵. Outros autores seguiram este modelo experimental de aplicação tópica de 0,5% de DMBA nas bolsas jugais de hamsters ^{16,17,26,81,84} e de ratos ²², bem como na aplicação da língua de hamsters ⁸².

Foi também descrita a implantação cutânea de *pellets* de DMBA, com 10mg de DMBA por 150g de massa corporal, em ratos jovens de 8 semanas ¹⁸. Neste estudo de Yasumata ¹⁸ pretendeu-se avaliar o efeito da testosterona em neoplasias das glândulas submandibulares de ratos fêmeas, comparando estes resultados com glândulas submandibulares de ratos machos normais, verificando a sua eventual estimulação do crescimento de neoplasias da próstata. Este autor obteve resultados positivos, com estabelecimento de linhas celulares neoplásicas e metabolização de sub-produtos lesivos ¹⁸.

O DMBA pode também ser administrado por gavagem ou sonda intra-gástrica em concentrações variáveis. No estudo de Jung ¹⁹, o objectivo era a determinação dos efeitos quimioprotectores de um sumo natural de uvas pretas, com administração posterior de DMBA por gavagem na dose de 34 mg/kg num veículo oleoso. O autor refere que a dose escolhida pretende a máxima obtenção de neoplasias, mas que ao mesmo tempo não induza a formação de neoplasias consideráveis que mascarassem o efeito quimio-preventivo da substância a testar. O autor concluiu que a administração de sumo natural de uvas pretas previamente à administração de DMBA inibiu processos oncogénicos na mama de ratos fêmeas ¹⁹. Outros autores seguiram este método experimental de administração por gavagem ^{23,24,25,27,83,89,90}.

Existem também modelos experimentais que recorrem à administração sub-cutânea de DMBA. Lee ²⁰ dispôs-se a avaliar o efeito do DMBA e do benzo(a)pireno (BaP), carcinogénicos presentes no fumo do tabaco, sobre o osso, usando o modelo experimental do rato ovariectomizado. Consegue-se assim avaliar os efeitos a longo termo sem interferências da função dos ovários, incluindo ainda um grupo que tinha reposição dos níveis de estrogénio e outro que não recebia esta terapia. Foi administrada por via sub-cutânea 250 µg/kg de DMBA e BaP, dose esta que tinha sido demonstrada num estudo anterior que correspondia à dose mínima para indução da actividade da CYP1A1 ²⁰. Os autores concluíram que o DMBA e o BaP são responsáveis, em parte, pelos efeitos deletérios do tabaco sobre o osso, podendo conduzir à osteoporose ²⁰. Estes reduzem as propriedades mecânicas do osso, levando ainda à diminuição da densidade mineral ²⁰.

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) tem também sido usada na indução experimental de neoplasias, embora usado principalmente para avaliação de neoplasias do cólon ^{86,87,88,89}. Os seus métodos de administração têm grande semelhança com os métodos usados na administração do DMBA. Um estudo de Viñas-Salas ⁸⁶ refere a administração de DMH por via sub-cutânea na dose de 21mg/kg, enquanto um estudo de Arul ⁸⁷ e outros dois de Kumar ^{88,94} referem a administração de DMH também por via sub-cutânea na dose de 20 mg/kg. Um estudo de Kitamura ⁸⁹ refere a administração de DMH por via sub-cutânea na dose de 40 mg/kg, verificando no entanto que esta dose era excessivamente tóxica e corrigindo-a posteriormente para 20 mg/kg ⁸⁹. Esta mesma dose de 40 mg/kg de DMH foi utilizada num estudo de Cheng ⁹⁰ e noutro ensaio de Patel ⁹³. Hambly ⁹¹ refere a administração de DMH por sonda intra-gástrica nas doses de 1, 5, 10 e 25 mg/kg, de acordo com os objectivos do estudo. Samanta ⁹² refere a administração de DMH na dose de 20 mg/kg por injeção intra-peritoneal.

Agente carcinogénico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

Muito embora se saiba que o acto de fumar tabaco acarreta um risco acrescido para a promoção e desenvolvimento de neoplasias, o seu exacto mecanismo responsável pelos seus inúmeros efeitos adversos, nomeadamente oncogénicos e tóxicos, tem apenas recentemente recebido explicações científicas sólidas, que no entanto não concluem a investigação e abrem novos caminhos ²⁰. Uma das dificuldades é o facto de que o fumo do tabaco possui 4000 compostos diferentes, sabendo-se até agora que o fumo do tabaco possui 43 tipos de carcinogénios diferentes ^{14,20}. Entre os vários componentes do

cigarro, sabe-se também que a nicotina é o elemento que apresenta maior concentração e que é um elemento-chave para a adicção ¹⁴. O benzo(a)pireno e o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) são dois hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no fumo do tabaco em altas concentrações (40-100 ng por cigarro), sabendo-se que o DMBA produz mutações em oncogenes e genes supressores que, em última instância levam a uma oncogénese estabelecida histologicamente ^{14,20}. A presença de DMBA durante a proliferação celular dificulta a acção dos mecanismos de reparação do DNA, perpetuando as lesões moleculares ^{14,20}. Pelas suas acções pró-oncogénicas, tem sido usado na indução de neoplasias da mama ^{19,23,25,28}, em modelos experimentais de perda óssea ²⁰ e na indução de neoplasias renais ²⁴.

O DMBA induz alterações no metabolismo do ácido araquidónico, tendo este sido sugerido como um importante passo molecular para o desenvolvimento das neoplasias orais ¹⁵, com o envolvimento de ambas as vias metabólicas da ciclo-oxigenase (Cox) e da lipo-oxigenase (Lox). O metabolito-chave presente na via metabólica da Cox é a prostaglandina E2 (PGE2), enquanto que as enzimas da via metabólica da Lox podem criar vários metabolitos, entre eles o leucotrieno B4 (LTB4) e o ácido 5-, 12- e 15-hidroieicosatetraenoico (HETE) ¹⁵. Sabe-se que estes metabolitos são potentes mediadores inflamatórios, uma vez que recrutam e activam células inflamatórias, aumentam a permeabilidade vascular e induzem a contracção dos músculos lisos ¹⁵. Tem ainda sido demonstrado com sucesso que tanto Cox-2 como 5-Lox têm a sua expressão aumentada em modelos experimentais de neoplasia oral em hamsters, bem como em neoplasias orais em humanos, enquanto inibidores específicos da Cox-2 e da 5-Lox são capazes de suprimir passos metabólicos e impedir a formação de neoplasias orais ¹⁵. Sabe-se ainda que LTB4 promove a oncogénese oral, enquanto múltiplos inibidores da via metabólica da 5-Lox tem efeitos de quimio-prevenção molecular na oncogénese ¹⁵.

Existe evidência crescente de uma interligação entre a via metabólica do ácido araquidónico com os receptores dos factores de crescimento epidérmicos (EGFR) ^{15,18}. Foi demonstrado que a activação de variadas moléculas sinalizadoras moduladas pelos EGFR, como sejam as MAPK, levam a uma sobre-transcrição genética do gene correspondente à Cox-2. Também foi sinalizada a relação entre os EGFR e as PGE2, que são capazes de estimular a proliferação celular através de trans-activação pelos EGRF ¹⁵. Um estudo pretendeu avaliar o efeito quimio-preventivo de uma substância-teste (GW2974), um inibidor duplo das tirosinas cinases de EGFR e de ErbB2, após administração experimental de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno ¹⁵. Os autores obtiveram resultados positivos, concluindo que este inibidor previne a oncogénese oral no modelo experimental, reforçando naturalmente as limitações que derivam da aplicação de

modelos animais e da sua relação directa com a patologia humana, que deverá ser criteriosamente analisada ¹⁵.

O DMBA tem também sido usado na indução tumoral para determinar a influência do stress oxidativo sobre as células tumorais, bem como a resistência das células normais ^{16,17}. A glutamina (GLN) é um aminoácido não-essencial, cujas concentrações atingem níveis extremamente baixos durante períodos de stress catabólico quando o seu uso excede a sua produção. A glutamyl-cisteinil-glicina (GSH) é um anti-oxidante do grupo dos sulfidrilos (-SH), presente em animais, plantas e micro-organismos. Esta GSH tem concentrações da ordem dos milimolar no interior das células, o que a torna num dos mais concentrados antioxidantes intra-celulares ^{16,17,22}. O rácio entre GSH reduzida e glutathione oxidada (GSSF), ou seja GSH/GSSG, é considerado um indicador sensitivo de stress oxidativo ^{16,17,22}. A oncogénese, a nível molecular, é caracterizada por marcada redução dos níveis de GLN no músculo esquelético, acompanhada por níveis baixos de GSH ^{16,22}. Estudos prévios mostraram que uma dieta oral com GLN causou a redução dos níveis intra-tumorais de GSH, enquanto permitiu o seu aumento dos níveis intra-celulares de células sãs ¹⁶. Isto é particularmente importante, uma vez que sendo a GSH um regulador-chave do estado redox celular, esta vai determinar a resposta dos tumores (e da própria protecção das células sãs) à quimio e à radioterapia ¹⁶. A resistência a uma grande variedade de agentes anti-tumorais está associada a grandes níveis intra-celulares de GSH nas células tumorais, indicando que uma redução do GSH poderá melhorar a sensibilidade destas células à quimio e à radioterapia ¹⁶.

O DMBA é um dos membros dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que estão também presentes no ambiente como produtos da combustão incompleta de hidrocarbonetos complexos ^{16,19,21,22}. Sendo um carcinógeno indirecto, o DMBA requer activação metabólica pelo citocromo P450 para formar um epóxido dihidrodiol e outras espécies reactivas ao oxigénio (ROS), estas que irão aumentar a oxidação intra-celular ^{16,19,22,25}. Como tal, a própria administração de anti-oxidantes pode muito bem retardar este processo ¹⁶. Um estudo avaliou a aplicação tópica da GLN após administração experimental de DMBA em hamsters, concluindo que a GLN inibiu completamente o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no modelo experimental ¹⁶. A segurança e eficácia da GLN enteral e parenteral e os seus benefícios na melhoria metabólica dos aminoácidos, função imune e o *out-come* dos voluntários humanos saudáveis e doentes com patologias catabólicas foi avaliado em pelo menos 18 estudos clínicos, tendo sido efectuada uma revisão sobre estes ¹⁶. Um estudo de fase II demonstrou a eficácia e segurança da GLN em doses ascendentes de metotrexato ¹⁶. Pela sua atoxicidade e baixo custo, a GLN pode ser um importante adjuvante no tratamento anti-neoplásico primário ¹⁶.

O DMBA tem um importante potencial lesivo do DNA, como já foi visto anteriormente. Sendo um hidrocarboneto aromático policíclico, este terá ligação ao receptor citosólico celular AhR, ou receptor de hidrocarbonos aril ^{23,27,29}. Após esta activação, o AhR transloca-se para o núcleo celular e associa-se com o co-factor ARNT, a proteína de translocação nuclear do AhR ^{23,27}. Este complexo liga-se depois a localizações específicas do DNA, a montante do gene que codifica o AhR, e induz a transcrição genética ^{23,27}. Só após estes passos se dá a metabolização do DMBA pelo citocromo P450, como anteriormente referido ^{23,27}. Contudo, existe evidência crescente que o AhR regula também o crescimento celular e a sua sobrevivência, tendo sido sugeridos mecanismos adicionais através dos quais o AhR contribuirá para a oncogénese ²³. Como tal, para além de uma actividade genética deletéria, o DMBA também altera de forma significativa as vias de sinalização celular e os seus sub-produtos decorrentes ²³. Uns destes exemplos são as vias Wnt e Pin1, envolvidas em alterações conformacionais das proteínas, sendo vias de sinalização fundamentais e alteradas em neoplasias da mama ²³.

Mais recentemente, o DMBA parece alterar também a expressão do ácido nítrico (NO) ²⁶. O NO tem sido sinalizado em vários estudos pelo seu papel importante em variados processos biológicos, nomeadamente em processos inflamatórios e na oncogénese ²⁶. O NO é um radical altamente reactivo, podendo reagir com outros grupos de radicais e formar compostos citotóxicos, como os peroxinitritos, conduzindo a variados danos genéticos ²⁶. A análise da presença e das características de iNOS, uma isoforma do NO, após administração experimental de DMBA, verificou uma predominância do iNOS nos queratinócitos dos hamsters tratados com DMBA. Tais níveis podem levar à criação de intermediários tóxicos capazes de provocar dano directo e indirecto aos tecidos, bem como genotoxicidade; por outro lado, o excesso de NO leva à inactivação do gene p53, com funções de supressão tumoral ²⁶.

Contribuição Pessoal

Material e Métodos

Preparação e distribuição dos animais

No estudo foram utilizados 16 ratos da estirpe Wistar com 2 meses de idade no início do ensaio, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Antes de iniciar o estudo, os animais foram submetidos a um período de quarentena de cinco dias.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente por dois grupos com igual número de elementos: o grupo controlo (Grupo CTRL 1) e o grupo teste (Grupo TST 2), cada um dos quais com 8 animais. Os animais do grupo controlo não sofreram qualquer tipo de manipulação durante todo o período do ensaio. O grupo teste foi submetido à administração de 25mg/kg de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) por sonda intragástrica, três vezes ao dia. Os animais de cada grupo foram alojados 3 por gaiola adequada à espécie.

Manutenção dos animais

Os ratos foram mantidos nas condições padrão do biotério, com temperatura de 22°C e 60-65% de humidade num regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os dois grupos, teste e controlo, foram mantidos com água *ad libitum* e ração standardizada durante duas semanas, findas as quais foram sacrificados todos os animais.

A vigilância para rastreio de alterações patológicas foi diária. A pesagem foi realizada semanalmente, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

Sacrifício, Colheitas e Registos

Todos os animais que chegaram ao fim da experiência foram eutanasiados e necropsiados. A eutanásia foi realizada por overdose com associação de cetamina 50 mg/ml (Ketalar®, Pfizer) e clorpromazina 25mg/ml (Largatil IV, Laboratórios Vitória).

Foi realizada a necrópsia completa de todos os animais, com registo da informação referente à observação do hábito externo, observação do hábito interno e colheita de fragmentos de tecidos, em modelo próprio em utilização no Instituto de Patologia Experimental.

Todos os fragmentos colhidos foram fixados em solução de formaldeído tamponado a 10%. Os fragmentos de músculos masseter e temporal foram fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% e em álcool etílico a 70%. Em todos os animais foram colhidos dois fragmentos de fígado e dos músculos masseter e temporal para congelação rápida em azoto líquido e posterior conservação a -70°C .

Histopatologia, Histoquímica e Histoenzimologia

Todos os fragmentos colhidos para histopatologia de rotina foram incluídos em parafina e realizados cortes com o micrótomo. Destas amostras foi realizado o estudo histológico de rotina, usando a metodologia padrão para coloração de Hematoxilina e Eosina.

Análise Morfométrica

Para cada músculo masseter e temporal de cada animal, foram realizadas 10 fotografias dos cortes histopatológicos transversais corados com Hematoxilina e Eosina e fixados previamente com álcool etílico a 70%, utilizando os padrões esterológicos de aquisição de imagem, com padronização da aleatorização dos campos fotografados.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio do programa desenvolvido pelos Institutos Nacionais de Saúde (EUA), Image J 1.42q, que permitiu a medição da área de secção das fibras musculares em corte transversal.

Assim, a variação deste parâmetro pode ser descrita utilizando a média, desvio padrão e coeficiente de variação. Com base nestes dados definem-se para o grupo controlo, sem patologia, cinco tipos de fibras musculares, de acordo com as secções observadas: fibras muito pequenas, fibras pequenas, fibras médias, fibras grandes e fibras muito grandes. Designamos de fibras médias aquelas cuja área se encontra compreendida no intervalo [média-SD; média+SD]. Designamos fibras grandes aquelas cujo valor da área se encontra incluído no intervalo [média+SD; média+2SD]. Designamos fibras pequenas quando o valor da área está incluído no intervalo [média-SD; média-2SD]. Consideramos que as fibras musculares são muito pequenas quando o valor da sua área se encontra

abaixo do considerado como fibras pequenas, e as fibras são consideradas como muito grandes quando a sua área excede a área das fibras grandes.

Análise Metabólica

Os fragmentos de tecido muscular foram colocados à temperatura ambiente para a realização de cortes que permitissem ter amostras com uma massa média de 30mg. Os tecidos foram colocados nos rotores, preenchidos com D₂O para permitir uma rotação constante de cada amostra. A espectroscopia de alta resolução com sonda ¹H (high resolution *magic angle spinning* NMR spectroscopy – HRMAS) foi realizada num espectrómetro Tesla Varian 14.1 (Varian NMR Inc.) com uma consola informática de software VNMRj para aquisição gráfica dos espectros. A temperatura da sonda foi mantida a 20°C e a rotação máxima da amostra a 3500 Hz.

Para cada amostra foram realizadas 128 leituras, com um tempo de aquisição total médio de 10 minutos.

A análise dos espectros com recurso ao software Nuts® permitiu a observação da variação de cada um dos metabolitos em análise e colheita de dados sobre o comportamento geral dos espectros nas diversas amostras do grupo muscular estudado em todos os indivíduos (masseter).

Resultados

Análise Morfométrica

Grupo Controlo

No grupo controlo observa-se uma distribuição uniforme das fibras musculares em corte transversal, com preservação dos diversos feixes.

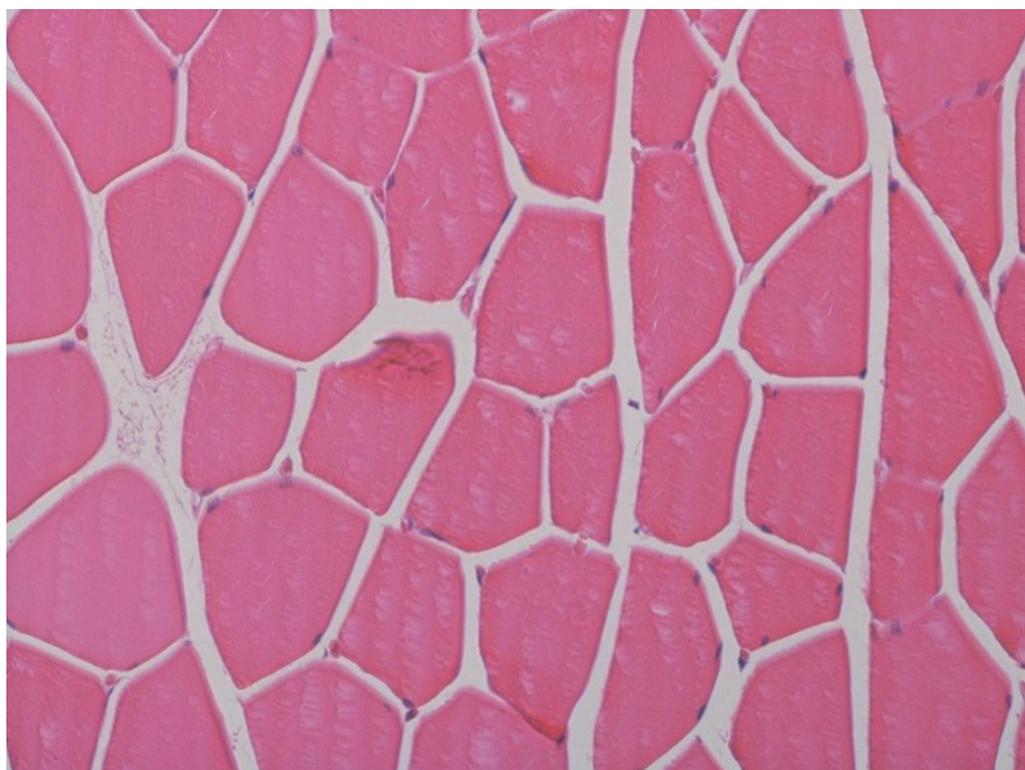


Figura n.º 1. Microfotografia de um corte de músculo masseter do grupo controlo. HE, 100X no original.

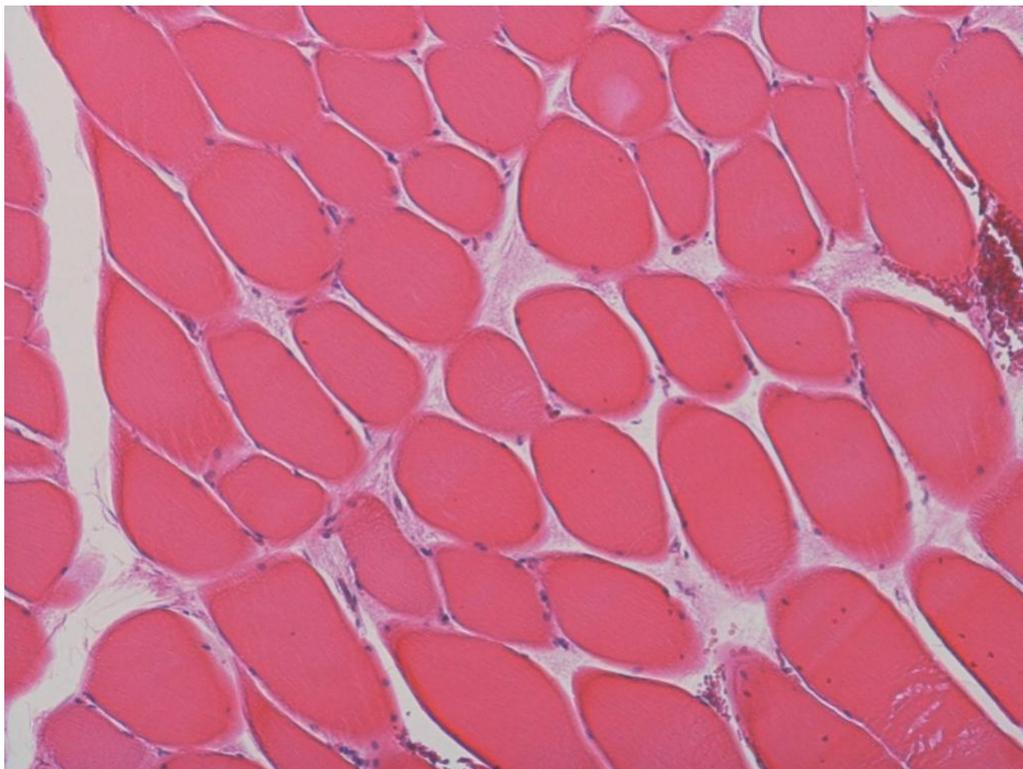


Figura n.º 2. Microfotografia de um corte de músculo temporal do grupo controle. HE, 100X no original.

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo masseter, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $10\,704 \pm 6\,835$ px, variando entre 3 869 e 17 539 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não se observam casos de fibras muito pequenas; 7,32% das fibras medidas são pequenas; 80,49% das fibras medidas são médias; 7,32% das fibras medidas são grandes e 7,32% das fibras medidas são muito grandes.

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo temporal, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $8\,103 \pm 2\,398$ px, variando entre 5 705 e 10 501 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não existem fibras musculares muito pequenas; 10,64% das fibras medidas são pequenas; 70,21% das fibras medidas são médias; 14,89% das fibras medidas são grandes e 2,13% das fibras medidas são muito grandes.

Grupo Teste

No grupo teste observa-se uma distribuição uniforme das fibras musculares em corte transversal, com preservação dos feixes. Não se observam quaisquer tipos de alterações histológicas, o que inclui a ausência de necrose, hemorragia, infiltrado inflamatório ou de focos de degenerescência.

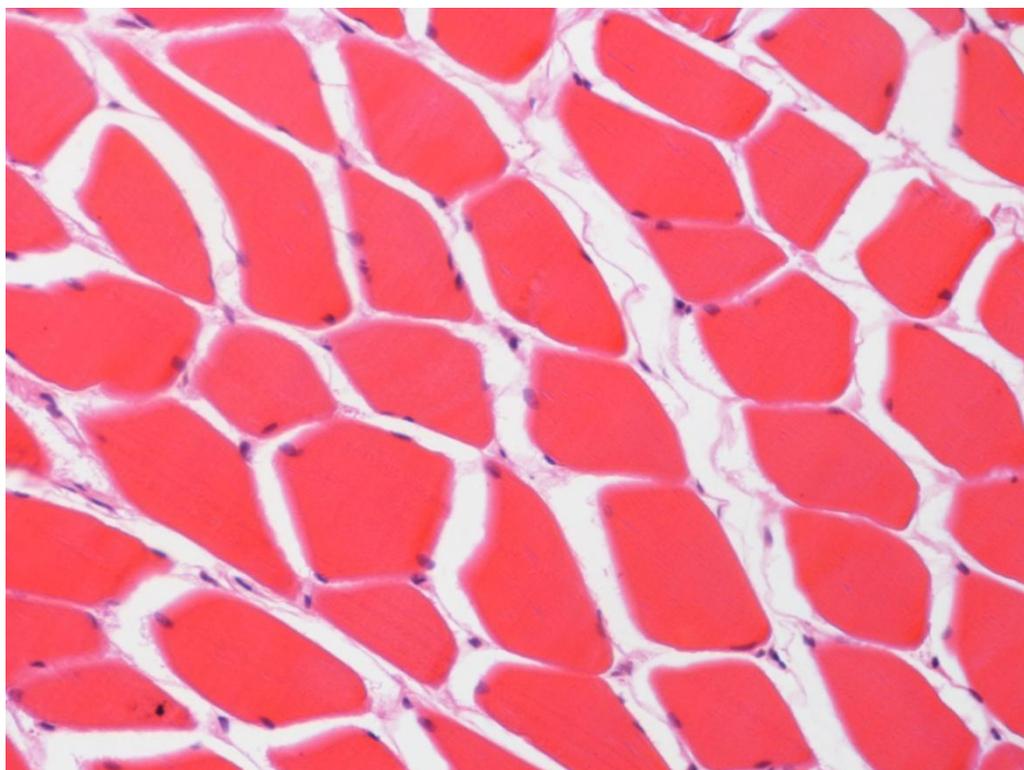


Figura n.º 3. Microfotografia de um corte de músculo masseter do grupo teste, sem qualquer sinal evidente de lesão morfológica. HE, 100X no original.

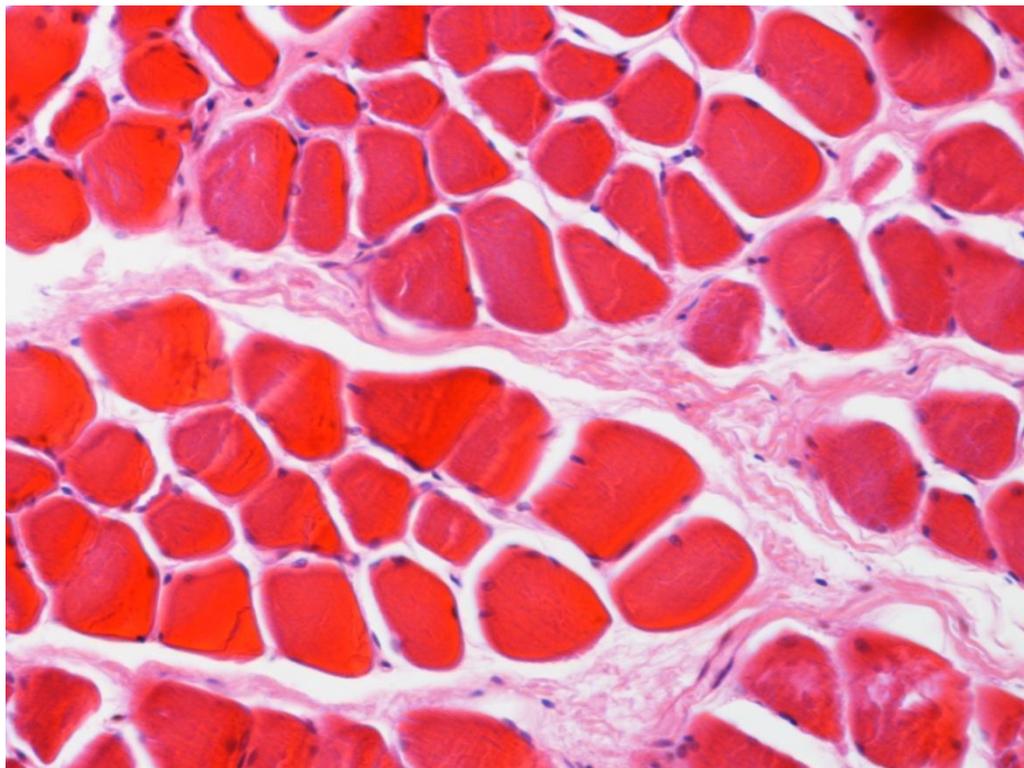


Figura n.º 4. Microfotografia de um corte de músculo temporal do grupo teste, sem qualquer sinal evidente de lesão morfológica. HE, 100X no original

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo masseter, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $9\,503 \pm 4\,283$ px, variando entre 4 920 e 13 786 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não se observam casos de fibras muito pequenas; 5,88% das fibras medidas são pequenas; 88,24% das fibras medidas são médias; 5,23% das fibras medidas são grandes e 0,65% das fibras medidas são muito grandes.



Figura n.º 5. Representação esquemática da área das fibras musculares em corte transversal no músculo masseter (a verde encontra-se representado o grupo teste e a azul encontra-se representado o grupo controlo).

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo temporal, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $16\,282 \pm 7\,315$ px, variando entre 8 967 e 23 597 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não existem fibras musculares muito pequenas; 2,90% das fibras medidas são pequenas; 17,39% das fibras medidas são médias; 14,49% das fibras medidas são grandes e 65,22% das fibras medidas são muito grandes.

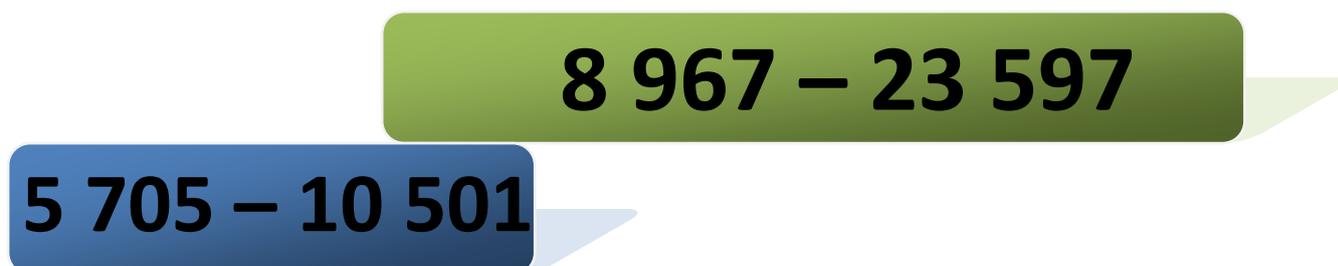


Figura n.º 6. Representação esquemática da área das fibras musculares em corte transversal no músculo temporal (a verde encontra-se representado o grupo teste e a azul encontra-se representado o grupo controlo).

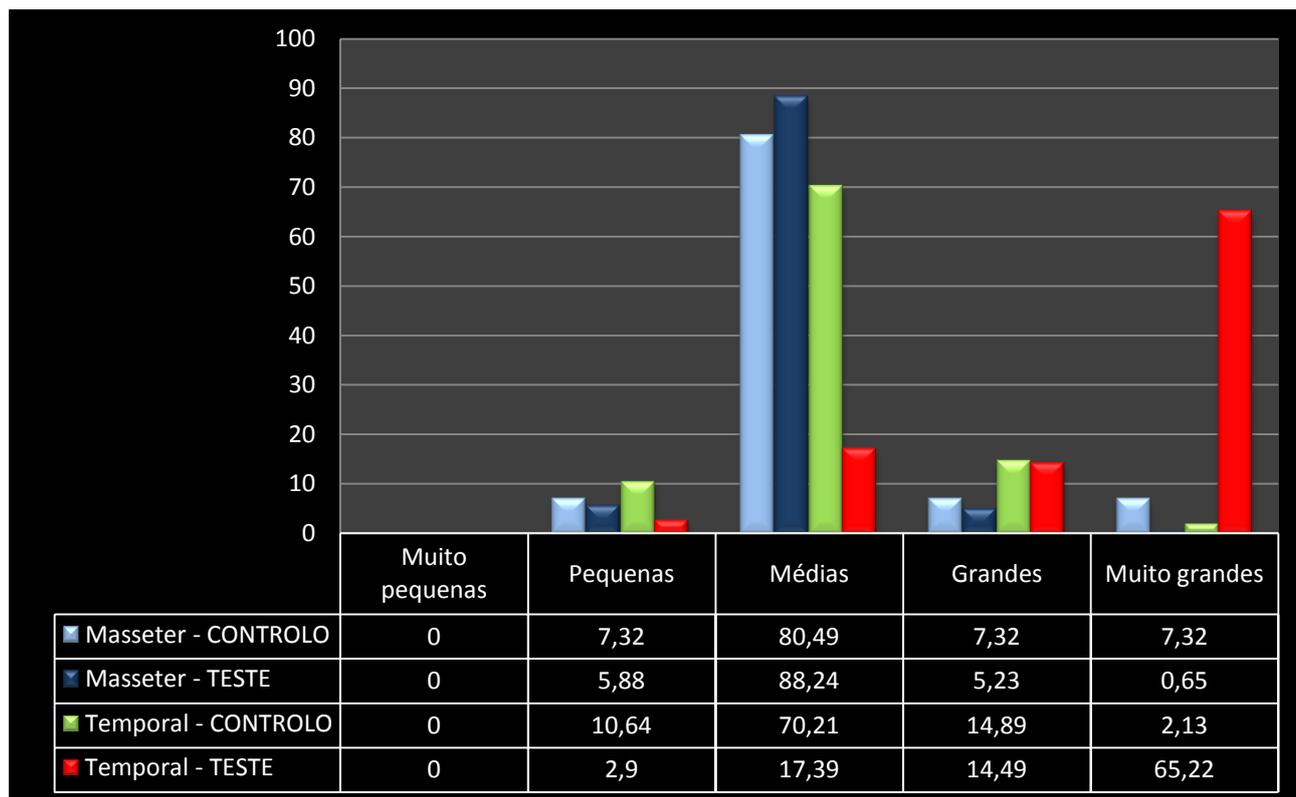


Figura n.º 7. Gráfico da distribuição das fibras musculares em corte transversal dos músculos mastigadores masseter e temporal.

Análise Metabolômica

A observação dos espectros obtidos permitiu a caracterização de alguns dos metabolitos considerados chave no metabolismo do tecido muscular e no sentido de servir de referência na análise e comparação dos espectros dos grupo teste e controle.

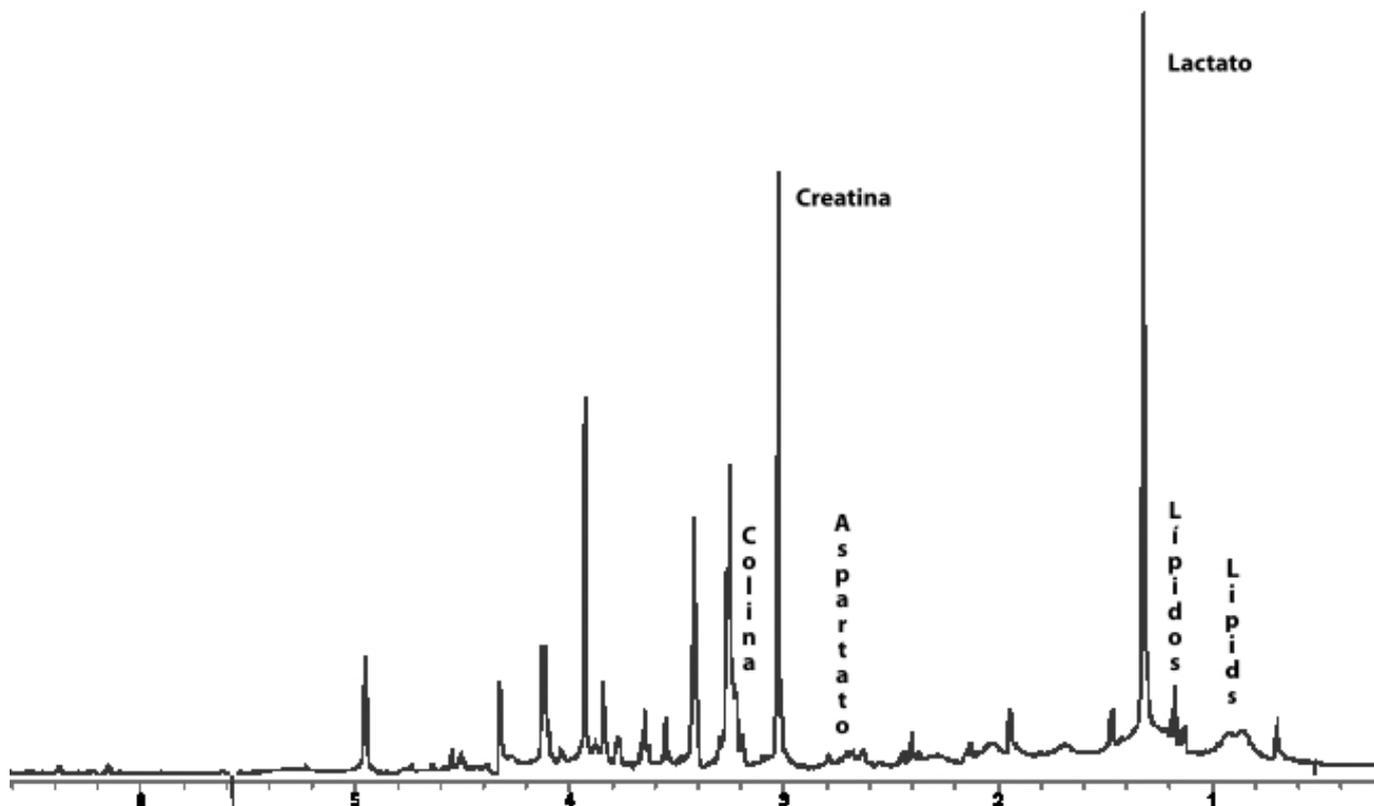


Figura n.º 9. Espectro obtido para o músculo masseter.

A análise estatística dos picos assinalados permitiu observar que: o aspartato tem uma intensidade de cerca de $64\,490,14 \pm 16\,321,20$; a colina tem uma intensidade de $27\,941,39 \pm 15\,000,14$; a creatina tem uma intensidade de $274\,396,30 \pm 67\,606,54$; o lactato tem uma intensidade de $355\,860,96 \pm 83\,859,95$; os lípidos apresentam-se com uma intensidade de $43\,497,18 \pm 12\,704,37$ e $36\,764,91 \pm 26\,191,96$.

Discussão

A pesquisa de moléculas sinalizadoras de processos patológicos apresenta-se como o objectivo primordial das investigações focadas na análise molecular. Poder ter um bio-marcador seguro e fiável, que permita o fornecimento de dados precisos sobre o diagnóstico, escolha do método de tratamento, factores de prognóstico, e talvez cada vez mais importante, o diagnóstico precoce, alcança sobeja importância num campo tão nobre e delicado como a oncologia.

O nosso objectivo com este trabalho é contribuir para a investigação e descoberta destes bio-marcadores, com o fornecimento de um modelo experimental que pudesse, por um lado, acrescentar validade científica ao modelo experimental escolhido, bem como por outro lado, fornecer aos investigadores em causa experiência e conhecimento para darem seguimento à análise e experimentação das alterações moleculares nos músculos mastigadores nestes modelos.

A análise genómica consiste na sequenciação e análise de todo o património genético presente na amostra sujeita a análise. A utilização de técnicas de ordenamento automático do DNA permitiu a descoberta do património genético humano e também de algumas espécies chave na experimentação animal ³⁰. Os microarrays de DNA revolucionaram a maneira de analisar os genes, através da monitorização simultânea dos produtos de RNA de milhares de genes ^{31,32,33,34,35,40,43,48}.

A proteómica é o equivalente proteico da genómica, englobando um vasto conjunto de tecnologias viradas para a determinação da identidade, quantidade e qualidade de proteínas expressas em diferentes células, bem como a sua estrutura tri-dimensional e interacções ⁶⁵. A proteómica define-se como o estudo de todas as proteínas produzidas pelas células ou por micro-organismos, envolvendo a identificação e quantificação das proteínas presentes no corpo e a determinação do seu papel em funções fisiológicas e fisiopatológicas ^{65,66,69,72}. O proteoma define-se como todo o conjunto proteico presente numa determinada célula ou micro-organismo ^{65,66,69,72}. Este campo da ciência tem tido bastante expressão na área da oncologia, nomeadamente na descoberta de grupos proteicos envolvidos na oncogénese, bem como na descoberta de bio-marcadores para o diagnóstico, prognóstico e detecção de recorrência ^{65,66}.

A análise metabolómica, de uma forma geral, consiste na identificação do maior conjunto de metabolitos possíveis presentes no tecido teste, na sua quantificação e comparação com as amostras de tecidos controlo disponíveis em bases de dados ^{49,50,51,52,53,60}. Dedicar-se ao estudo da sua composição, dinâmica, interações e respostas a mudanças ambientais nas células, tecidos e bio-fluidos ⁵⁴. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) tem sido a ferramenta de eleição para a análise metabolómica ⁴⁹.

A técnica de imunohistoquímica é utilizada para localizar proteínas num determinado tecido; se visar a análise de uma célula ou de uma população de células designa-se imunocitoquímica. Tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos, geralmente IgG's mas também IgM's, contra a proteína que se pretende identificar e localizar nesse tecido ^{73,74,77}. É uma técnica coadjuvante que não substitui o diagnóstico histológico tradicional ⁷⁴.

Numa primeira parte procedemos à avaliação histológica e morfométrica dos músculos mastigadores do grupo controlo e do grupo teste. A análise morfométrica do músculo masseter indica-nos um ligeiro aumento da área das fibras musculares, sem significância estatística. Verifica-se um ligeiro aumento do número de fibras de tamanho médio e decréscimo dos outros grupos de fibras (*figuras nºs 5 e 7*). No músculo temporal, por sua vez, observámos alterações da área das fibras com significado estatístico, principalmente das fibras muito grandes (*figuras nºs 6 e 7*). Torna-se interessante a análise molecular deste grupo muscular, que será realizada posteriormente.

Os resultados da análise morfométrica deram já origem a um poster intitulado "*Morphometric evaluation of masticator muscles after experimental administration of a carcinogen*", com o código LB441, que foi apresentado num congresso internacional de Biologia Experimental (Experimental Biology'10, Anaheim, CA, USA).

Segundo Tiziani ⁸, os padrões metabólicos dos doentes com neoplasias orais estão alterados por comparação do espectro teste com o espectro controlo. Os doentes com carcinoma de células escamosas possuem padrões lipolíticos alterados, como resultado da acumulação de corpos cetónicos, com desregulação do ciclo de Krebs e anormal catabolismo de grupos de aminoácidos ⁸. Um estudo prévio em tumores *ex vivo* demonstrava concentrações elevadas de taurina, colina, ácido glutâmico, ácido láctico e lípidos, quando comparando estes tumores de células escamosas com tecido normal e íntegro ⁸.

Torna-se essencial a existência de espectros de tecidos saudáveis para a sua comparação posterior com tecidos alterados. Com vista a proceder ao estudo molecular do músculo masseter procedemos à análise metabolómica do grupo controlo de forma a determinar os metabolitos chave para o nosso futuro estudo. Obtivemos picos de intensidade correspondentes aos metabolitos aspartato, creatina, lactato e lípidos (*figura n.º 9*). Estes valores entram em concordância com um estudo de Chen ⁹⁵ que usou tecido muscular humano saudável obtido de margens de tumores excisados. Este autor, especificamente, verificou picos de creatina e descreveu a sua distribuição no músculo esquelético ⁹⁵. No entanto, e sabendo que existe enorme variabilidade metabólica, esta comparação de metabolitos musculares humanos e animais possui, de momento, pouca relevância.

Conclusões

Este estudo experimental demonstrou-nos que o agente carcinogénico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno poderá provocar alterações a nível dos músculos mastigadores, e por alguma razão se reflecte especialmente no músculo temporal, muito embora não nos seja possível, nesta fase, avançar com explicações que esclareçam as alterações verificadas.

São necessários mais estudos nesta área uma vez que todos os estudos por nós encontrados têm feito análises metabólicas em diferentes tecidos e com modelos experimentais que não aquele por nós usado, pelo que se torna ainda mais aliciante a sua investigação.

Através dos resultados obtidos pela análise histológica e morfométrico, podemos ainda concluir que o modelo experimental para a oncogénese induzida por DMBA administrado através de sonda intra-gástrica é válido, tal como outros autores tinham já referenciado.

O estudo metabólico dos músculos do grupo teste possibilitar-nos-á a obtenção de respostas mais concretas acerca da influência do DMBA nos músculos mastigadores, que será efectuado posteriormente.

Resumo

As neoplasias da cavidade oral continuam a reclamar grandes prejuízos para a saúde e bem-estar de muitos doentes em todo o mundo. Muito embora se saiba cada vez mais dos processos oncogénicos e das suas características morfo-histológicas, existem ainda dificuldades a superar.

O advento da análise molecular, nas suas diferentes variantes, permite a obtenção de novos paradigmas que até há alguns anos eram considerados quase utópicos.

A metabolómica, especialmente na sua variante de espectrometria NMR por HRMAS, se aplicada em tecidos neoplásicos e comparada com tecidos saudáveis, permite a obtenção de dados que se pensam ser cada vez mais críticos para a escolha do tratamento a efectuar, influências sobre factores prognósticos e, mais fundamental, na obtenção de diagnósticos precoces da doença.

No presente estudo foram usados 16 ratos da estirpe Wistar com 2 meses de idade. Estes foram divididos aleatoriamente por 2 grupos, um grupo controlo e um grupo teste. O grupo controlo não sofreu qualquer tipo de manipulação. O grupo teste foi submetido à administração de 25 mg/kg de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno por sonda intra-gástrica, três vezes ao dia. Todos os animais foram mantidos em condições padrão do biotério, com água e ração standard *ad libitum* até duas semanas, findas as quais foram sacrificados. Todos os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e os fragmentos dos músculos masseter e temporal foram fixados em etanol a 70%. Foram ainda colhidos fragmentos dos músculos masseter e temporal de todos os animais para congelação rápida e conservação em azoto líquido a -70°C. Todos os fragmentos foram incluídos em parafina líquida e cortados num micróto, para posterior coloração histológica por HE de rotina. Foram posteriormente efectuadas análises morfométricas e metabolómica. Na análise morfométrica foram analisadas fibras musculares em corte transversal e medida a sua área de secção. Foram definidas cinco classes de fibras musculares – muito pequenas, pequenas, médias, grandes e muito grandes – sendo posteriormente catalogadas. Para a análise metabolómica, os fragmentos do músculo temporal do grupo controlo foram colhidos e analisados num espectrómetro HRMAS de alta resolução com sonda ^1H , sendo o espectro obtido posteriormente analisado.

Os resultados da análise morfométrica revelaram um ligeiro aumento das fibras musculares provenientes do músculo masseter, com pouca significância. Já as fibras musculares provenientes do músculo temporal revelaram um grande aumento na área de

secção, de relevância significativa. Na análise metabolómica determinámos os metabolitos-chave presentes nos músculos masseter do grupo controlo, para estudos posteriores.

Em conclusão, podemos afirmar que o agente 7,12-dimetilbenz(a)antraceno provoca alterações nos músculos mastigadores, especialmente nos músculos temporais, sendo necessários estudos mais aprofundados.

Abstract

Oral neoplasias continue to claim a great toll on the health and well-being of patients worldwide. Even though studies about oncogenic processes and morpho-histological characteristics add up valuable information, there are still some obstacles to overcome.

Molecular analysis with their multiple methods and protocols allows the achievement of newer informations that once were considered utopia.

Metabolomics in its ^1H HRMAS form can be applied successfully when analyzing diseased tissue and comparing it to healthy tissue, obtaining valuable information with regards to treatment methods, prognosis factors, and more importantly, early diagnosis.

On the current study, 16 male Wistar rats, with 2 months of age, were divided in two groups randomly (control and test group). All animals were kept in standard bioterium conditions, with ad libitum water and standardized ration. Animals in the test group were doused with 25mg/kg 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by gavage, during two weeks on the end of which they were sacrificed. All fragments were fixed in 10% buffered formaldehyde and fragments of masseter and temporal muscles were collected and fixed in 70% ethanol. In all animals, two fragments of masseter and temporal muscles were collected for quick-freezing and conservation in -70°C liquid nitrogen. All fragments collected for routine histopathology were included in liquid paraffin and cut in a microtome, being then colorized in HE standard protocol. Morphometric and metabolomic analysis to the masticator muscles was then performed. In the morphometric analysis, muscular fibers were analyzed in transversal cuts, measuring their section area. Five muscle fiber groups – very small, small, medium, large and very large - were then defined and both groups were then categorized. In the metabolomic analysis, fragments collected from masseter muscle control group were submitted to high-resolution ^1H probe HRMAS, analyzing each of the metabolites obtained through the control spectra.

The results obtained from morphometric analysis revealed a slight increase in muscle fiber area from masseter muscles, with little significance. Temporal muscle, on the other hand, revealed a significant increase in muscle fiber area. In the metabolomic analysis we determined the key metabolites derived from control masseter muscles for future studies.

In conclusion, we are able to say that 7,12-dimethylbenz(a)anthracene can induce alterations in masticator muscles, especially in the temporal muscle, being however necessary further studies.

Bibliografia:

1. Marques *et al* (2008); *Oral Health, Hygiene Practices and Oral Cancer*; Rev Saúde Pública; Vol. 42 (3); 471-479
2. Garrote *et al* (2001); *Risk Factors for Cancer of the Oral Cavity and Oro-pharynx in Cuba*; British Journal of Cancer; Vol. 85 (1); 46-54
3. Kabat *et al* (1989); *Risk Factors for Oral Cancer in Women*; Cancer Research; Vol. 49; 2803-2806
4. Dumitrescu (2007); *Attitudes of Romanian Dental Students Towards Tobacco and Alcohol*; J Contemp Dent Pract; Vol. 8 (3); 64-71
5. Talamini *et al* (2000); *Oral Hygiene, Dentition, Sexual Habits and Risk of Oral Cancer*; British Journal of Cancer; Vol. 83 (9); 1238-1242
6. Morse *et al* (1996); *Smoking and Drinking in Relation to Oral Epithelial Dysplasia*; Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention; Vol. 5; 769-777
7. Hashibe *et al* (2000); *Chewing Tobacco, Alcohol, and the Risk of Erythroplakia*; Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention; Vol. 9; 639-645
8. Tiziani *et al* (2009); *Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using ¹H NMR-based Metabolomics*; Neoplasia; Vol. 11; 269-276
9. Kuo *et al* (2002); *Gene Expression Profiling by DNA Microarrays and its Application to Dental Research*; Oral Oncology; Vol. 38; 650-656
10. Bowden *et al* (2004); *DNA Microarray Technology: Insights for Oral and Maxillofacial Surgeons*; British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery; Vol. 42; 542-545
11. Garant (2003); *Oral Cells and Tissues*; Quintessence Books; 299-320
12. Carneiro (2004); *Histologia Básica – texto e atlas*, 10ª edição; Guanabara Koogan
13. Despopoulos (2003); *Color Atlas of Physiology*, 5th Edition; Thieme
14. Bersch (2006); *Efeito da nicotina Injectável e da Fumaça do Cigarro em um Modelo Experimental de Lesões Intra-epiteliais e de Adenocarcinoma Pancreático Induzidos por 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) em Camundongos*; Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia
15. Sun *et al* (2008); *Chemoprevention of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)-induced Oral Carcinogenesis in Hamster Cheek Pouch by Topical Application of a Dual Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and ErbB2 Tyrosine Kinases*; Oral Oncology; Vol. 44; 652-657
16. Lim *et al* (2009); *Glutamine Prevents DMBA-induced Squamous Cell Cancer*; Oral Oncology; Vol. 45; 148-155

17. Saroja *et al* (2001); *Coffee Enhances the Development of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)-induced Hamster Buccal Pouch Carcinomas*; Oral Oncology; Vol. 37; 172-176
18. Kato *et al* (1996); *Testosterone Metabolism in New Squamous Cell Carcinoma Cell Line (RSS18) from 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene-induced Submandibular Gland of Female Rat*; J Steroid Biochem Molec Biol; Vol. 57 (5/6); 349-355
19. Jung *et al* (2006); *Purple Grape Juice Inhibits 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)-induced Rat Mammary Tumorigenesis and in Vivo DMBA-DNA Adduct Formation*; Cancer Letters; Vol. 233; 279-288
20. Lee *et al* (2002); *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Cigarette Smoke Cause Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model*; Bone; Vol. 30 (6); 917-923
21. Flesher *et al* (2004); *Formation of Benzylic Alcohols and Meso-aldehydes by One-electron Oxidation of DMBA, a Model for the First Metabolic Step in Methylated Carcinogenic Hydrocarbon Activation*; Polycyclic Aromatic Compounds; Vol. 24; 501-511
22. Muqbil *et al* (2006); *Enhancement of Pro-oxidant Effect of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) in Rats by Pre-exposure to Restraint Stress*; Cancer Letters; Vol. 240; 213-220
23. Currier *et al* (2005); *Oncogenic Signaling Pathways Activated in DMBA-induced Mouse Mammary Tumors*; Toxicologic Pathology; Vol. 33; 726-737
24. Fu *et al* (2005); *Dietary Modulation of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)-induced Adrenal Toxicity in Female Sprague-Dawley Rats*; Food and Chemical Toxicology; Vol. 43; 765-774
25. Scheneider *et al* (2002); *Effects of DMBA Preparation on DMBA-induced Rat Mammary Carcinogenesis*; Polycyclic Aromatic Compounds; Vol. 22; 831-839
26. Chen *et al* (2000); *Immunohistochemical Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in DMBA-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis*; Oral Oncology; Vol. 36; 221-224
27. Singhal *et al* (2009); *Estrogenic Status Modulates the Effect of Soy on Hepatic Responses to 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)*; Toxicology and Applied Pharmacology; Vol. 234; 89-97
28. Macejová *et al* (2001); *Chemically Induced Carcinogenesis: a Comparison of 1-Methyl-1-Nitrosourea, 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene, Diethylnitroso-amine and Azoxyethan Models (Minireview)*; Endocrine Regulations; Vol. 35; 53-59
29. Birnbaum *et al* (2000); *Non-carcinogenic Effects of TCDD in Animals*; Food Additives and Contaminants; Vol. 17 (4); 275-288
30. Lodish *et al* (2008); *Molecular Cell Biology – Sixth Edition*; Freeman
31. Alberts *et al* (2007); *Fundamentos de Biologia Celular – 2ª Edição*; Artmed

32. Francois *et al* (2003); *DNA Microarrays for Detecting Endocrine-disrupting Compounds*; *Biotechnology Advances*; Vol. 22; 17-26
33. Rhodius *et al* (2009); *Technical Considerations in Using DNA Microarrays to Define Regulons*; *Methods*; Vol. 47; 63-72
34. Meloni *et al* (2004); *DNA Microarrays and Pharmacogenomics*; *Pharmacological Research*; Vol. 49; 303-308
35. Lamartine (2006); *The Benefits of DNA Microarrays in Fundamental and Applied Bio-medicine*; *Materials Science and Engineering*; Vol. 26; 354-359
36. Hughes *et al* (2001); *DNA Microarrays for expression Profiling*; *Current Opinion in Chemical Biology*; Vol. 5; 21-25
37. Jaumot *et al* (2006); *Exploratory Data Analysis of DNA Microarrays by Multivariate Curve Resolution*; *Analytical Biochemistry*; Vol. 358; 76-89
38. Hayashi (2004); *Prediction of Hormone Sensitivity by DNA Microarray*; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; Vol. 58; 1-9
39. Krenn *et al* (2004); *Array Technology and Proteomics in Autoimmune Diseases*; *Pathology – Research and Practice*, Vol. 200; 95-103
40. Ye *et al* (2001); *Applications of DNA Microarrays in Microbial Systems*; *Journal of Microbiological Methods*; Vol. 47; 257-272
41. Park *et al* (2006); *Fluorescence-based Assay Formats and Signal Amplification Strategies for DNA Microarray Analysis*; *Chemical Engineering Science*; Vol. 61; 954-965
42. Hanai *et al* (2006); *Application of Bioinformatics for DNA Microarray Data to Bioscience, Bioengineering and Medical Fields*; *Journal of Bioscience and Bioengineering*; Vol. 101 (5); 377-384
43. Hal *et al* (2000); *The application of DNA microarrays in gene expression analysis*; *Journal of Biotechnology*; Vol. 78; 271-280
44. Epstein *et al* (2000); *Microarray Technology – Enhanced Versatility, Persistent Challenge*; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol. 11; 36-41
45. Parsons *et al* (2009); *How to Make Tissue Microarrays*; *Diagnostic Histopathology*; Vol. 15 (3); 142-150
46. Bendixen *et al* (2005); *Functional Genomics in Farm Animals – Microarray Analysis*; *Meat Science*; Vol. 71; 128-137
47. Haslett *et al* (2002); *Microarray Analysis of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle*; *Int J Devl Neuroscience*; Vol. 20; 359-365
48. Stenger *et al* (2002); *Potential applications of DNA microarrays in biodefense-related diagnostics*; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol. 13; 208-212

49. Morvan *et al* (2007); *Metabolomics by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Response to Chloroethylnitrosourea Reveals Drug Efficacy and Tumour Adaptive Metabolic Pathways*; *Cancer Res* ; Vol. 67 (5); 2150-2159
50. Dunn *et al* (2005); *Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 24 (4); 285-294
51. Moco *et al* (2007); *Metabolomics Technologies and Metabolite Identification*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 26 (9); 855-866
52. Van *et al* (2009); *How Close is the Bench to the Bedside? Metabolic Profiling in Cancer Research*; *Genome Medicine*; Vol. 1 (5); 5.1-5.6
53. Robertson (2005); *Metabonomics in Toxicology: a Review*; *Toxicological Sciences*; Vol. 85; 809-822
54. Oresic (2009); *Metabolomics, a Novel Tool for Studies of Nutrition, Metabolism and Lipid Dysfunction*; *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*; Vol. 19; 816-824
55. Wishart (2008); *Quantitative Metabolomics Using NMR*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 27 (3); 228-237
56. Weckwerth *et al* (2005); *Metabolomics: From Pattern Recognition to Biological Interpretation*; *DDT*; Vol. 10 (22); 1551-1558
57. Tohge *et al* (2009); *Web-based Resources for Mass-Spectrometry-Based Metabolomics: a User's Guide*; *Phytochemistry*; Vol. 70; 450-456
58. Madsen *et al* (2010); *Chemometrics in Metabolomics – a Review in Human Disease Diagnosis*; *Analytica Chimica Acta*; Vol. 659; 23-33
59. Straus (2004); *Recent developments en solid-state magic-angle spinning, nuclear magnetic resonance of fully and significantly isotopically labeled peptides and proteins*; *Phil Trans R Soc Lond*; Vol. 359; 997-1008
60. Issaq *et al* (2009); *Analytical and Statistical Approaches to Metabolomics Research*; *J Sep Sci*; Vol. 32; 2183-2199
61. Powers (2009); *NMR Metabolomics and Drug Discovery*; *Magn Reson Chem*; Vol. 47; S2-S11
62. Reo (2002); *NMR-based Metabolomics*; *Drug and Chemical Toxicology*; Vol. 25 (4); 375-382
63. Wishart *et al* (2007); *HMDB: the Human Metabolome Database*; *Nucleic Acids Research*; Vol. 35; D521-D526
64. Spratlin *et al* (2009); *Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: a Review*; *Clin Cancer Res*; Vol. 15 (2); 431-440
65. Cho (2007); *Proteomics Technologies and Challenges*; *Geno Prot Bioinfo*; Vol. 5 (2); 77-85

66. Chuthapisith *et al* (2007); *Principles of Proteomics and its Applications in Cancer*; Surgeon; Vol. 5 (1); 14-22
67. Bachi *et al* (2008); *Quantitative Proteomics as a New Piece of the Systems Biology Puzzle*; Journal of Proteomics; Vol. 71; 357-367
68. Anderson *et al* (2000); *Proteomics: Applications in Basic and Applied Biology*; Current Opinion in Biotechnology; Vol. 11; 408-412
69. Silberring *et al* (2010); *Biomarker Discovery and Clinical Proteomics*; Trends in Analytical Chemistry; Vol. 29 (2); 128-140
70. Lombardi *et al* (2009); *Defining the Transcriptomic and Proteomic Profiles of Rat Ageing Skeletal Muscle by the Use of a cDNA Array, 2D- and Blue Native-Page Approach*; Journal of Proteomics; Vol. 72; 708-721
71. Celis *et al* (2000); *Gene Expression Profiling: Monitoring Transcription and Translation Products Using DNA Microarrays and Proteomics*; FEBS Letters; Vol. 480; 2-16
72. Naaby-Hansen *et al* (2001); *Proteomics - Post-genomic Cartography to Understand Gene Function*; TRENDS in Pharmacological Sciences; Vol. 22 (7); 376-384
73. Santos; *Princípios Básicos de Imunocitoquímica*; Departamento de Zoologia FCTUC
74. Folpe (1999); *Practical Applications of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Soft Tissue Neoplasms*; Surgical Oncology; Vol. 8; 197-203
75. Moreau *et al* (1998); *Approach to Automation in Immunohistochemistry*; Clinica Chimica Acta; Vol. 278; 177-184
76. Warford *et al* (2004); *Expression Profiling by High-throughput Immunohistochemistry*; Journal of Immunological Methods; Vol. 290; 81-92
77. Warford *et al* (2007); *Assessing the Potential of Immunohistochemistry for Systematic Gene Expression Profiling*; Journal of Immunological Methods; Vol. 318; 125-137
78. D'Amico *et al* (2009); *State of the Art in Antigen Retrieval for Immunohistochemistry*; Journal of Immunological Methods; Vol. 341; 1-18
79. Neel *et al* (1998); *Comparative Evaluation of Automated Systems in Immunohistochemistry*; Clinica Chimica Acta; Vol. 278; 185-192
80. Eisen (2008); *Quality Management in Immunohistochemistry*; Diagnostic Histopathology; Vol. 14 (7); 299-307
81. Chen *et al* (2003); *Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis*; Oral Diseases; Vol. 9; 235-240

82. Monteiro *et al* (2008); *Aspectos clínicos, histopatológicos e histoquímicos de carcinoma epidermóide bucal induzido quimicamente em mucosa lingual de hamsteres sírios dourados (mesocricetus auratos)*; Rev Inpeo Odont; Vol. 2 (2); 18-29
83. Shan *et al* (2002); *cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyrine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene*; Carcinogenesis; Vol. 23 (10); 1561-1568
84. Vairaktaris *et al* (2007); *Abundance and localization of skeletal muscle-related erbB2 may stimulate tumour growth during initial stages of oral oncogenesis*; J Musculoskelet Neuronal Interact; Vol. 7 (2); 185-190
85. Ravosa *et al* (2010); *Masticatory biomechanics and masseter fiber-type plasticity*; J Musculoskelet Neuronal Interact; Vol. 10 (1); 46-55
86. Viñas-Salas *et al* (1998); *Calcium inhibits colon carcinogenesis in an experimental model in the rat*; Eur Journal Cancer; Vol. 34 (12); 1941-1945
87. Albert-Baskar *et al* (2010); *Chemopreventive effect of Cynodon dactylon (L.) Pers. extract against DMH-induced colon carcinogenesis in experimental animals*; Exper Toxic Pathology; Vol. 62; 423-431
88. Kumar *et al* (2010); *Inhibitory effect of morin on DMH-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in experimental colon carcinogenesis*; Envir Toxicol and Pharmac; Vol. 29; 50-57
89. Kitamura *et al* (2006); *Lack of chemopreventive effects of α -eleostearic acid on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) – induced mammary and colon carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats*; Food and Chemic Toxicol; Vol. 44; 271-277
90. Cheng *et al* (2003); *Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats*; Cancer Letters; Vol. 196; 161-168
91. Hambly *et al* (2002); *Influence of dietary components associated with high or low risk of colon cancer on apoptosis in the rat colon*; Food and Chemic Toxicol; Vol. 40; 801-808
92. Samanta *et al* (2008); *Vanadium and 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ combination in inhibitions of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) – induced rat colon carcinogenesis*; Biochim et Biophy Acta; Vol. 1780; 1106-1114
93. Patel *et al* (2008); *Polymeric black tea polyphenols inhibit 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis by inhibiting cell proliferation via Wnt/ β -catenin pathway*; Toxicol and App Pharm; Vol. 227; 136-146

94. Kumar *et al* (2009); *Modifying effects of morin on the development of aberrant crypt foci and bacterial enzymes in experimental colon cancer*; Food and Chem Toxicol; Vol. 47; 309-315
95. Chen *et al* (2008); *Resolution of creatine and phosphocreatine ^1H signals in isolated human skeletal muscle using HRMAS ^1H NMR*; Magn Reson Med; Vol. 59 (6); 1221-1224

Índice

Agradecimentos	
Introdução	1
Aspectos morfo-funcionais dos músculos mastigadores	
Histofisiologia do músculo esquelético	2
Organização do músculo esquelético	3
Métodos de avaliação molecular dos músculos mastigadores	
Genómica	5
Proteómica	7
Metabolómica	9
Imunohistoquímica	12
Modelos de oncologia experimental	14
Agente carcinogénico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno	16
Contribuição pessoal	20
Materiais e métodos	
Preparação e distribuição dos animais	20
Manutenção dos animais	20
Sacrifício, colheita e registos	20
Histopatologia	21
Análise morfométrica	21
Análise molecular	22
Resultados	
Análise morfométrica	23
Análise molecular	29
Discussão	30
Conclusão	33
Resumo	34
Summary	35
Bibliografia	37