



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AUGUSTO CÉSAR LEAL DA SILVA LEONEL

**O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
CONVERSoras DA ANGIOTENSINA 1 E 2**

Recife
2023

AUGUSTO CÉSAR LEAL DA SILVA LEONEL

**O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
CONVERSoras DA ANGIOTENSINA 1 E 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Recife

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

L583o Leonel, Augusto César Leal da Silva.
O sistema renina-angiotensina no carcinoma de células escamosas de boca: avaliação da expressão das enzimas conversoras da angiotensina 1 e 2 / Augusto César Leal da Silva Leonel – 2023.
87 p.

Orientadora: Danyel Elias da Cruz Perez
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Recife, 2023.
Inclui referências e anexos.

1. Câncer. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Boca. 4. Sistema renina-angiotensina. 5. Enzima conversora de angiotensina. Perez, Danyel Elias da Cruz (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 187)

AUGUSTO CÉSAR LEAL DA SILVA LEONEL

**O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS
CONVERSoras DA ANGIOTENSINA 1 E 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada

Aprovado em: 24 / 02 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Elaine Judite de Amorim Carvalho (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

A **Deus**, pois, sem Ele, nada disso seria possível.

Aos meus pais **Elma Leal** e **Francisco Leonel**, por todo suporte, amor, compressão, confiança e dedicação. Essa conquista é nossa!

À minha Avó **Almira Leal**, pelo carinho e amor de sempre. A senhora é um exemplo de ser humano ímpar!

Ao meu irmão **Luís Henrique Leal**, pelo amor, parceria e torcida.

À **Keldiane Oliveira**, minha namorada, por todo amor, compreensão, companheirismo e incentivo dados durante todos esses anos. Obrigado por sempre confiar em mim!

A todos os meus familiares, por todo amor, suporte, incentivo durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor, orientador e amigo **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, pelo acolhimento, pelos ensinamentos, amizade, dedicação, confiança e por acreditar em mim. O senhor é um exemplo de profissional e de ser humano, espelho para os seus alunos. Obrigado por tudo.

Às professoras da disciplina de Patologia Oral, **Prof. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro** e **Prof. Dra. Elaine Judite de Amorim Carvalho**, por todo apoio e ensinamentos compartilhados, vocês foram essenciais no meu crescimento.

Às professoras da disciplina de Radiologia, **Prof. Dra. Andrea dos Anjos Pontual Pontual**, **Prof. Dra. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez** e **Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual**, pelo acolhimento e apoio dados durante a graduação, pós-graduação e nos dois anos que passamos juntos nas disciplinas de Radiologia. A confiança a mim dada foi essencial para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor **Prof. Dr. Alfredo Macedo Gomes** e ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia**, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, pela oportunidade e honra de fazer parte de seu corpo discente. Agradeço também ao funcionário **Antônio Gomes**, por ser sempre prestativo e atencioso.

A todos os colegas e amigos do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, por todo apoio, incentivo, auxílio e risadas compartilhadas.

Aos meus amigos da vida (Floresta, Recife, graduação), por darem toda força e suporte em vários momentos. Vocês deixaram o processo mais leve. Obrigado por tudo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Oral da UFPE e aos funcionários **Seu Rogério** (in memorian) e **Ademilton Santos** por todo auxílio.

Ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – UFPE, especialmente o **Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego** e a doutoranda **Maria Clara Sampaio**, pelas contribuições e parceria na realização desse trabalho.

A CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela concessão da bolsa de Doutorado.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo e diversos mecanismos existentes nos tecidos locais já foram relacionados à tumorigênese, dentre eles o Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Recentemente, estudos vêm demonstrando evidências crescentes de que a desregulação nesse sistema leva a uma gama de efeitos patológicos, incluindo o desenvolvimento e a progressão do câncer, entre eles o carcinoma de células escamosas (CCE) de boca. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a expressão da enzima conversora da angiotensina (ECA) 1 e 2, componentes do SRA, em CCE de boca e em amostras de mucosa oral sadia. O estudo foi caracterizado como transversal retrospectivo baseado na análise de dados clínico-patológicos e imunohistoquímicos de 30 amostras de CCEs de boca e 10 amostras de mucosa oral sadia. A avaliação da expressão imunohistoquímica (IHC) das proteínas investigadas foi realizada com o uso de um sistema de pontuação semiquantitativo que analisa a porcentagem de células positivas e a intensidade de coloração delas, obtendo-se ao final o índice de coloração (IC). As médias dos IC para ECA1 e 2 foram submetidas à estatística. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A coloração IHC mostrou expressão da ECA 1 e 2, em porcentagens e intensidades diferentes, no citoplasma das células do epitélio neoplásico maligno, nas ilhas de células malignas que invadiram o tecido conjuntivo, além dos fibroblastos, vasos sanguíneos, nervos periféricos, fibras musculares esqueléticas e tecido glandular presentes no microambiente tumoral. Já nas amostras de mucosa oral saudável só houve expressão positiva para a ECA2. Os níveis de marcação positivos para a ECA1 foram maiores nos tecidos malignos ($p < 0,05$) e da ECA2 nos tecidos saudáveis ($p < 0,05$). As taxas de expressão da ECA1 se correlacionaram proporcionalmente com o estado de diferenciação do tumor ($p = 0,001$) e a imunomarcação da ECA1 e 2 em células epiteliais malignas foi positivamente correlacionada com a imunomarcação dessas proteínas nos componentes do estroma de tecido conjuntivo subjacente ($p < 0,05$). Os resultados encontrados contribuem para a melhor compreensão do papel do SRA nesta doença e a expressão das enzimas desse sistema no CCE de boca pode levantar a possibilidade do uso dessas como alvos terapêuticos neste tumor.

Palavras-chave: Câncer; Carcinoma de Células Escamosas; Boca; Sistema Renina-Angiotensina; Enzima Conversora de Angiotensina.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide and several existing mechanisms in local tissues have already been related to tumorigenesis, including the Renin-Angiotensin System (RAS). Recently, studies have shown increasing evidence that deregulation in this system leads to a range of pathological effects, including the development and progression of cancer, including oral squamous cell carcinoma (SCC). The aim of this research was to evaluate the expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) 1 and 2, components of the RAS, in SCC of the mouth and in samples of healthy oral mucosa. The study was characterized as a retrospective cross-sectional study based on the clinicopathological and immunohistochemical data analysis of from samples of oral SCCs and 10 samples of healthy oral mucosa. The immunohistochemical expression (IHC) of the investigated proteins was evaluated using a semi-quantitative scoring system that analyzes the percentage of positive cells and their staining intensity, finally obtaining the staining index (CI). CI means for ACE 1 and 2 were submitted to statistics. For all tests, a significance level of 5% was considered ($p < 0.05$). IHC staining showed expression of ACE 1 and 2, in different percentages and intensities, in the cytoplasm of cells of the malignant neoplastic epithelium, in the islands of malignant cells that invaded the connective tissue, in addition to fibroblasts, blood vessels, peripheral nerves, skeletal muscle fibers and glandular tissue present in the tumor microenvironment. In samples of healthy oral mucosa, there was only positive expression for ACE2. Positive marker levels for ACE1 were higher in malignant tissues ($p < 0.05$) and ACE2 in healthy tissues ($p < 0.05$). ACE1 expression rates correlated proportionally with tumor differentiation state ($p = 0.001$) and immunostaining of ACE1 and 2 in malignant epithelial cells was positively correlated with immunostaining of these proteins in underlying connective tissue stromal components ($p < 0.05$). The results contribute to a better understanding of the role of the RAS in this disease. The expression of enzymes from this system in SCC of the mouth may raise the possibility of using them as probable therapeutic targets in this tumor.

Keywords: Cancer; Squamous Cell Carcinoma; Mouth; Renin-Angiotensin System; Angiotensin Converting Enzyme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

- Figura 1 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-1 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais do parênquima tumoral positivas para ECA-1 (100x). (B) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-1 (200x). (C) Fibroblastos positivos para ECA-1 (200x). (D) Endotélio vascular positivo para ECA-1 (200x). (E) Fibras musculares positivas para ECA-1 (200x). (F) Nervo periférico positivo para ECA-1 (400x) 40
- Figura 2 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais do parênquima tumoral positivas para ECA-2 (100x). (B) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (200x). (C) Fibroblastos negativos para ECA-2 (200x). (D) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (E) Fibras musculares positivas para ECA-2 (200x). (F) Nervo periférico negativo para ECA-2 (200x) 43
- Figure 3 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de mucosa oral saudável (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células do revestimento epiteliai positivas para ECA-2 (100x). (B) Fibroblastos negativos para ECA-2 (400x) (C) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (D) Fibras musculares negativas para ECA-2 (200x) 44
- Figura 4 - Diagramas de dispersão mostrando a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nas células epiteliais malignas contra a

expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nos componentes do estroma subjacente	50
--	----

ARTIGO – O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS CONVERSoras DA ANGIOTENSINA (ECA)-1 E 2

Figura 1 –	Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-1 e da ECA-2 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase) (A) Células epiteliais do parênquima tumoral positivas para ECA-1 (100x). (B) Células epiteliais neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (100x). (C) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-1 (200x). (D) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (200x). (E) Fibroblastos positivos para ECA-1 (200x). (F) Fibroblastos negativos para ECA-2 (200x). (G) Endotélio vascular positivo para ECA-1 (200x). (H) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (I) Fibras musculares positivas para ECA-1 (200x). (J) Fibras musculares positivas para ECA-2 (200x). (K) Nervo periférico positivo para ECA-1 (400x). (L) Nervo periférico negativo para ECA-2 (200x)	73
Figura 2 –	Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de mucosa oral saudável (método estreptavidina-biotina-peroxidase) (A) Células do revestimento epitelial positivas para ECA-2 (100x). (B) Fibroblastos negativos para ECA-2 (400x) (C) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (D) Fibras musculares negativas para ECA-2 (200x)	75
Figura 3 –	Diagrama de dispersão mostrando a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nas células epiteliais malignas contra a expressão e nos componentes do estroma	76

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos e ocupação dos pacientes da amostra com Carcinoma de Células Escamosas de boca	37
Tabela 2 - Resultados da expressão imunoistoquímica da ECA1 e da ECA2 nas amostras de Carcinoma de Célula Escamosas de boca	45
Tabela 3 - Teste t comparando as médias dos IC das expressões imunoistoquímicas da ECA1 e da ECA2 nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas de boca	46
Tabela 4 - Análise da imunoexpressão da ECA1 segundo o grau de diferenciação celular nas amostras de Carcinomas de Células Escamosas de boca	48

ARTIGO – O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS CONVERSoras DA ANGIOTENSINA (ECA)-1 E 2

Tabela 1 - Resultados da expressão imunoistoquímica da ECA1 e da ECA 2 nos casos de Carcinoma de Célula Escamosas de boca	71
Tabela 2 - Comparação das médias dos IC das expressões imunoistoquímicas da ECA1 e da ECA2 nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas de boca	72
Tabela 3 - Análise da imunoexpressão da ECA1 segundo o grau de diferenciação celular nas amostras de Carcinomas de Células Escamosas de boca	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ANG (1-7)	Angiotensinas 1–7
ANG (1-9)	Angiotensina 1–9
ANOVA	Análise de Variância
ATI	Angiotensina I
ATII	Angiotensina II
ATIIR1	Receptor 1 da angiotensina II
ATIIR2	Receptor 2 da angiotensina II
BAX	Enzima pró-apoptótica
BCL2	Enzima antiapoptótica
BRA	Bloqueadores da ATIIR1
CCE	Carcinomas de Células Escamosas
COX2	Cicloxygenase 2
ECA1	Enzima Conversora de Angiotensina 1
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
FAC	Fibroblastos Associados ao Câncer
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia De Granulócitos-Macrófagos
HE	Hematoxilina Eosina
HR	Taxa de Risco
IC	Índice de Coloração
IECA	Inibidores da ECA

IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IHC	Imunoistoquímica
ISRA	Inibidores do sistema renina angiotensina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MasR	Receptor Mas
MCP1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NK	Natural killer
NF-kB	Fator nuclear kappa β
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAK1	Quinase 1 ativada pelo gene 21
PCR	Proteína C reativa
PI3Ks	Fosfoinosítido 3-quinase
PRR	Receptor pró-renina
ROS	Espécies Reativas De Oxigênio
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
SRAA	Inibidor do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TGF β	Fator de crescimento transformador β
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	18
2.2	MECANISMOS DE DESRREGULAÇÃO DO SRA	19
2.2.1	Mutações germinativas	19
2.2.2	Mutações somáticas	20
2.2.3	Outros mecanismos de desregulação do SRA	20
2.3	INFLUÊNCIA DO SRA DESRREGULADO NA BIOLOGIA DO CÂNCER	21
2.3.1	A relação do SRA com o microambiente tumoral	23
2.4	APLICABILIDADE CLÍNICA DOS INIBIDORES DO SRA NO CÂNCER	24
2.5	EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DO SRA EM CCE DE CABEÇA E PESCOÇO	27
3	OBJETIVOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	31
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E POPULAÇÃO	31
4.3	AMOSTRA	31
4.3.1	Seleção da amostra	31
4.3.2	Dados clínicos da amostra	32
4.4	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	33
4.4.1	Método imunoistoquímico	33
4.4.2	Análise imunoistoquímica	34
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS	36
5.1	PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DA AMOSTRA	36
5.2	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	37
5.2.1	Imunoexpressão da ECA1	37
5.2.2	Imunoexpressão da ECA2	41

5.2.3	Análise comparativa da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2	46
5.2.4	Análise da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 segundo o grau de diferenciação celular do tumor	47
5.2.5	Análise da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 segundo o a localização do tumor	49
5.2.6	Correlação entre a imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 no epitélio neoplásico com a imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 nos componentes do estroma subjacente	49
6	ARTIGO – O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS CONVERSoras DA ANGIOTENSINA (ECA)-1 E 2	51
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo, gerando uma grande carga econômica e de saúde para a sociedade (FENG et al., 2020). Os carcinomas de células escamosas (CCE) de boca, que compreendem lábio, língua (porção oral), assoalho bucal, palato duro, mucosa bucal, alvéolos maxilar e mandibular e o trígono retromolar, representam a 16^a neoplasia mais comum em todo o mundo, com aproximadamente 377.713 novos diagnósticos e 177.757 novos óbitos estimados em 2020 (FEATHERSTON et al., 2016; SUNG et al., 2021; GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020). No Brasil, o número de novos casos esperados, para cada ano do de triênio 2023 a 2025, é de 15.100 casos, sendo o 5º tipo mais prevalente entre os homens (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Fatores de risco e etiológicos para o CCE de boca incluem o tabaco fumado e não fumado, o álcool, a infecção pelo papiloma vírus humano subtipos oncogênicos, deficiência imunológica, exposição a raios ultravioletas para o câncer de lábio, desequilíbrio alélico envolvendo genes supressores de tumor, proto-oncogenes e enzimas metabolizadoras de carcinógenos (HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MIRANDA-FILHO & BRAY, 2020). Os tratamentos abrangem cirurgia e radioterapia isoladamente como tratamento primário ou em combinação para lesões de grau avançado, a quimioterapia como complemento em casos de recidiva e, mais recentemente, tratamentos direcionados baseados nas alterações moleculares envolvidas na sua tumorigênese (imunoterapia). Apesar de todas essas modalidades, a mortalidade ainda permanece alta (CHATTERJEE, LASKAR & CHAUKAR, 2020; DHAR, VAISH & D'CRUZ, 2020; HSU et al., 2020).

O perfil molecular do CCE de boca é relativamente mal compreendido, dificultando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Estudos indicam que o estroma tumoral desempenha um papel crítico na progressão do tumor, sugerindo que fatores relacionados a esse microambiente podem representar alvos viáveis para uma nova geração de agentes terapêuticos (PRIME et al, 2017; PELTANOVA, RAUDENSKA & MASARIK, 2019; HSU et al., 2020). Portanto, é importante buscá-los ativamente.

Vários mecanismos parácrinos existentes nos tecidos locais estão envolvidos na tumorigênese. Um desses mecanismos é o sistema renina-angiotensina (SRA),

que existe localmente no tecido de vários órgãos, incluindo a mucosa oral. (HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; SILJEE et al., 2021).

O SRA é um importante sistema enzimático peptídico que resulta em efeitos sistêmicos, quando sintetizados nos tecidos. Dentre as funções sistêmicas se destacam os efeitos cardiovasculares, endócrinos e neuronais (NAKAMURA et al., 2011; RAM et al., 2017). Estudos têm demonstrado evidências crescentes de que a desregulação do SRA leva a uma ampla gama de efeitos patológicos locais, incluindo o desenvolvimento e a progressão do câncer (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NALLAIAH et al., 2019; YANG et al., 2021). A expressão alterada de vários componentes desse sistema foi demonstrada em tecidos patológicos, como hiperplasia mamária e neoplasias malignas de mama, pulmão, pâncreas, próstata, câncer de pele, glioblastoma multiforme e CCE de cabeça e pescoço, incluindo o de boca (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; LIU et al., 2012; PINTER & JAIN, 2017; NALLAIAH et al., 2019; YANG et al., 2021).

Dentro do SRA, o eixo que envolve a Enzima Conversora de Angiotensina 1 (ECA1) parece atuar promovendo o crescimento do tumor por meio da modulação na angiogênese do tecido, proliferação celular, apoptose e inflamação, estando também envolvido em processos necessários para a metástase do tecido, como a regulação da célula para adesão celular, degradação de proteínas da matriz extracelular, migração e invasão (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; LIU et al., 2012; PINTER & JAIN, 2017; AFSAR et al., 2021). Por outro lado, o eixo da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), descoberta mais recentemente, interage para antagonizar as ações da sua homóloga, a ECA1, através de uma variedade de mecanismos, incluindo inibição da proliferação celular, invasão e metástase e inibição da transição epitelial-mesenquimal (PINTER & JAIN, 2017; NALLAIAH et al., 2019, AFSAR et al., 2021). Além disso, os componentes do SRA também são expressos em muitos tipos celulares do microambiente tumoral, como células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T (PINTER & JAIN, 2017). O uso de inibidores do SRA (ISRA) tem sido associado a menor crescimento e maior sobrevida no câncer. O bloqueio desse sistema pode representar uma alternativa para o tratamento de tumores sólidos.

(HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; SILJEE et al., 2021).

Embora o SRA tenha sido implicado na tumorigênese, como visto anteriormente, ainda há poucos dados que demonstrem a expressão desse sistema nos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os CCE de boca (YASUMATSU et al., 2004; FEATHERSTON et al., 2016; BAILLIE et al., 2016; HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; NALLAIAH et al., 2019; SILJEE et al., 2021). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de ECA1 e 2 em amostras de CCE de boca e em amostras de mucosas orais sadias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Na fisiologia do corpo humano existem diversos sistemas homeostáticos e alguns deles são mais abrangentes, atuando inclusive de modo a ajustar ou anular outros. Esses sistemas abrangentes são normalmente sustentados por um complexo processamento enzimático, dando origem a múltiplos produtos finais ativos, além de uma série de receptores e conjuntos de sinalização que atuam em diversos órgãos. O principal deles é SRA e alterações estão ligadas a disfunções e doenças (GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010).

O SRA é um importante sistema enzimático peptídico sintetizado tanto na circulação como nos tecidos locais. Esse sistema é responsável por um dos mais potentes mecanismos de vasoconstrição, constituído por um conjunto de peptídeos, enzimas e receptores envolvidos no controle do volume de líquido extracelular, controle da pressão arterial, controle endócrino e neuronal e modulação do crescimento celular. A cascata de reação inicia-se com a renina clivando o angiotensinogênio para que ocorra a formação do decapeptídeo inativo chamado angiotensina I (ATI). A ECA1 é uma metaloproteinase que converte então a ATI em angiotensina II (ATII). ATII é o principal efector do SRA e medeia seus efeitos por meio do receptor 1 da angiotensina II (ATIIR1) e do receptor 2 da angiotensina II (ATIIR2). Ao se ligar ao ATIIR1, a ATII causa constrição dos vasos e aumento da pressão, além de localmente mediar o crescimento celular, a resposta inflamatória, induzir a angiogênese e ter ação anti-apoptótica. Esse receptor é expresso em muitos tecidos adultos, incluindo vasos sanguíneos, córtex adrenal, fígado, rim e cérebro (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010).

Por outro lado, a ATII ao se ligar ao ATIIR2 causa principalmente efeitos opostos aos do ATIIR1: vasodilatação e queda da pressão arterial. Sua expressão ocorre predominantemente durante a vida fetal, mas está presente em um nível baixo em alguns tecidos adultos, como a medula adrenal, útero e folículos ovarianos (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010). Entretanto, investigações recentes relataram um papel desse receptor no sistema cardiovascular, cerebral e renal e na modulação de vários processos que agem no desenvolvimento

de órgãos, na diferenciação celular e no reparo de tecidos, inclusive podendo ser pró-angiogênico e pró-inflamatório (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018).

No início dos anos 2000 foi identificado um novo membro do SRA, a ECA2. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana com domínio catalítico extracelular que apresenta homologia com a ECA1, estando presente em muitos tecidos com altas concentrações no coração, rim e via gastrointestinal (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; LAMBERT, HOOPER & TURNER, 2008).

A ECA2 secretada catalisa a clivagem da ATI em angiotensinas 1–9 [ANG (1-9)] e da ATII nas angiotensinas vasodilatadoras 1–7 [ANG (1-7)]. Enquanto a afinidade com a primeira é pobre em comparação com a ECA1, tornando improvável que seja um substrato fisiológico (exceto sob condições em que a atividade da ECA1 é inibida), a ECA2 cliva eficientemente ATII em ANG (1-7) (LAMBERT, HOOPER & TURNER, 2008; FENG et al., 2020). A ANG-(1-7), por sua vez, interage com o seu receptor Mas (MasR), agindo como depressora, vasodilatadora, apoptótica, antiproliferativa e inibidora da angiogênese, tendo assim influência inibitória em muitos dos eventos induzidos por ATII (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008).

A variedade de respostas fisiológicas ao SRA reflete os peptídeos e receptores alternativos e as diferentes vias de sinalização que eles induzem. O equilíbrio entre esses eventos de sinalização influenciará o fenótipo proliferativo e angiogênico das células que respondem direta ou indiretamente ao SRA (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008). Além de suas ações sistêmicas do SRA, efeitos locais em diversos tecidos têm sido relatados, tais como hipertrofia, hiperplasia, fibrose e remodelação, disfunção endotelial, aneurismas, pró-respostas inflamatórias, diferenciação celular e hematopoiese (GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010). Portanto, pode-se levantar a hipótese de que o desequilíbrio entre os componentes do SRA contribuirá para o crescimento tumoral, angiogênese e potencial metastático.

2.2 MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO DO SRA

2.2.1 Mutações germinativas

Os mecanismos genéticos e/ou epigenéticos implícitos responsáveis pela expressão alterada do SRA durante a tumorigênese são pouco

compreendidos. Porém, estudos genéticos já demonstraram que mutações germinativas em componentes desse sistema contribuem para o risco de desenvolver certas malignidades (GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; DU et al., 2022).

O gene ECA humano está localizado no cromossomo 17q23 e contém numerosos polimorfismos. O mais conhecido é o polimorfismo de inserção/deleção (I/D), responsável por até 50% da variação observada nos níveis plasmáticos da ECA, onde a média dos níveis dos portadores D/D é duas vezes maior que a dos portadores I/I (GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; DU et al., 2022). Em pacientes com CCE de boca o genótipo D/D do gene ECA foi o mais prevalente, conferindo uma probabilidade de desenvolver metástase linfonodal 2,16 vezes maior quando comparado aos pacientes com o genótipo I/I (LIU et al., 2012).

2.2.2 Mutações somáticas

Poucos estudos discutiram as mutações somáticas e como elas podem afetar a expressão ou atividade do SRA. Rhodes e colaboradores (2009) avaliaram, em cânceres de mama, a correlação entre a superexpressão do ATIR1 com o rearranjo genômico e aberrações no número de cópias e concluíram que o ganho no número de cópias parece contribuir para uma maior expressão. Em casos de câncer de ovário a superexpressão de ATIR1 estava correlacionada com baixa sobrevida (PARK et al., 2014).

2.2.3 Outros mecanismos de desregulação do SRA

É provável que a desregulação das vias de sinalização a montante tenha um papel importante, talvez até dominante, na ativação do SRA durante a transformação maligna. A expressão de componentes SRA, em particular ATIR1, é regulada em vários tipos celulares por uma ampla gama de fatores de crescimento e hormônios, incluindo citocinas, óxido nítrico, estrogênio, progesterona e radicais livres. Como essas vias de sinalização regulam muitos fatores adicionais que estão envolvidos na malignidade, estudos direcionados são necessários para determinar até que ponto a desregulação do SRA contribui diretamente para a sinalização maligna (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010).

2.3 INFLUÊNCIA DO SRA DESREGULADO NA BIOLOGIA DO CÂNCER

A transformação maligna está associada a pelo menos seis capacidades funcionais adquiridas: angiogênese sustentada, evasão da apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, invasão de tecido e metástases e potencial replicativo ilimitado. O SRA atua em todas essas capacidades, embora mais proeminentes sejam seus efeitos na angiogênese, invasão, sinalização pró-sobrevivência e proliferação (GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; NALLAIAH et al., 2019).

A ATII local, agindo através do ATIIIR1, pode regular a secreção de vários fatores de crescimento e citocinas no microambiente tumoral, aumentando o crescimento de células do arcabouço, como fibroblastos e células endoteliais de formação vascular. Isso ocorre porque a ativação dessa via estimula a expressão de vários agentes pró-angiogênicos e fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietina 2, fator básico de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento derivado de plaquetas (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NAKAMURA et al., 2011). Mais recentemente foi descoberto que ATII também pode promover o crescimento e a proliferação celular por meio do fator de crescimento beta transformador, da tirosina quinase e da ativação das vias do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (AFSAR et al., 2021).

Outra via influenciada pelo SRA é a via de sinalização da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), também envolvida na oncogênese. A AMPK tem uma função supressora de tumor através da parada do ciclo celular com estabilização do gene p53 e dos inibidores de quinase dependentes de ciclina p21WAF1 e p27CIP1. Essa via também inibe a síntese de mTOR-1 e fator induzível por hipóxia-1 α , juntamente com ácidos graxos, triglicerídeos, colesterol, glicogênio, RNA ribossômico e proteínas, resultando na inibição do crescimento celular. O PRR também desempenha papéis importantes em várias vias, como as vias Wnt/ β -catenina, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)/quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK) e fosfoinosítídeos 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT)/mTOR, que estão envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, incluindo a tumorigênese (HARDIE & ALESSI, 2013).

O SRA também pode afetar a sobrevivência e/ou proliferação celular e, portanto, ter um efeito direto no número de células cancerígenas vivas dentro dos tumores. A ATII pode estimular ou inibir a proliferação dependendo se o ATIIIR1 ou o ATIIIR2 está ativado. ATIIIR1 age induzindo a mitose em células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais e aumenta a expressão de oncogenes relacionados ao crescimento e fatores de crescimento em vários tipos celulares e, por isso, a taxa de proliferação pode diferir para diferentes tipos de células (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NAKAMURA et al., 2011).

Em um ambiente hipóxico e inflamatório as células imunes inatas, principalmente neutrófilos e macrófagos, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Um ambiente tumoral hipóxico, juntamente com o acúmulo excessivo de ROS, leva ao estresse oxidativo, seguido por modificações aumentadas de proteínas, dano celular e morte ou podem sinalizar o SRA, contribuindo para a ativação de fatores de crescimento e para a proliferação e angiogênese (FRUEHAUF & MEYSKENS, 2007; AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NAKAMURA et al., 2011, DEVAUX & CAMOIN, 2022).

Ainda em um ambiente inflamatório, as células tumorais expressam e/ou secretam várias moléculas incluindo interleucina-8 (IL-8), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), VEGF, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), inibidor tecidual da metaloproteinases 1 e fator 1-alfa induzível por hipóxia. Corroborando com essas ações induzidas pelas próprias células tumorais, vários tipos de células inflamatórias também demonstraram expressar componentes SRA no microambiente tumoral e responder à estimulação da ATII aumentando a secreção de interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), MCP1, fator de necrose tumoral alfa e GM-CSF, o que poderia potencializar o ambiente inflamatório do câncer e a angiogênese (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; WEGMAN-OSTROSKY ET AL., 2015).

A relação do SRA com a apoptose também merece atenção especial e o elemento chave é o gene p53. A sinalização de ATIIIR1 afeta o p53 e influencia na razão entre a enzima antiapoptótica (Bcl-2) e a enzima pró-apoptótica (Bax), diminuindo a apoptose (AFSAR et al., 2021). Um estudo evidenciou que o inibidor da ECA inalapril aumentou os níveis de p53 e possivelmente a apoptose, sugerindo que ATII inibe a expressão de p53 (BRATLIE et al., 2017).

Quanto a Ang (1-7), já foi demonstrado que ela exerce efeitos inibitórios na inflamação e nos mecanismos de crescimento vascular e celular via MasR (AFSAR et al., 2021). Esse mediador demonstrou potencializar a bradicinina, um potente vasodilatador do sistema cinina e a regulação positiva do eixo ECA2/Ang (1-7)/MasR parece promover a expressão de moléculas de adesão E-caderina suprimindo a via quinase 1 ativada pelo gene 21 (PAK1)/ fator nuclear kappa B (NF-κB)/ fator de transcrição Snail1 (DEVAUX & CAMOIN, 2022). Em geral, o eixo foi relatado como protetor em vários tipos de câncer por uma variedade de mecanismos, incluindo inibição da proliferação celular, invasão e metástase e inibição da transição epitelial para mesenquimal (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NAKAMURA et al., 2011).

2.3.1 A relação do SRA com o microambiente tumoral

As células tumorais não crescem isoladamente. Uma complexa interação tumor-hospedeiro é necessária para facilitar processos como a proliferação do tumor, o escape da depuração imune apropriada mediada pelo hospedeiro, a remodelação da matriz, bem como metástase para locais distantes. Um componente substancial da massa tumoral compreende células de linhagem mielomonocítica (supressor derivado de células mielóides, macrófagos associados a tumores) bem como células T reguladoras, fibroblastos, células estromais e endoteliais (OKWAN-DUODU ET AL., 2013; OOSTHUIZEN & STURROCK, 2022). É nesse contexto que se acredita haver a principal influência do SRA no microambiente tumoral, através da promoção de um meio imunossupressor (PINTER & JAIN, 2017).

Ao regular os fibroblastos associados ao câncer (FAC) e as vias pro-fibrogênicas, o SRA desempenha um papel fundamental no estabelecimento de um ambiente desmoplásico, que afeta a resposta imune de várias maneiras (PINTER & JAIN, 2017). Os FAC podem manipular o sistema imunológico diretamente inibindo as funções das células T e natural killer (NK), promovendo o acúmulo de células supressoras e mantendo um meio inflamatório pro-tumorigênico (ÖHLUND; ELYADA & TUVESON, 2014). A fibrose do microambiente tumoral representa uma barreira física à infiltração de células T, além de comprimir os vasos sanguíneos. A perfusão tumoral reduzida resulta em um meio hipóxico e ácido, que promove a reprogramação de macrófagos em um fenótipo imunossupressor, prejudicando as funções de morte

tumoral das células imunes e regulando positivamente a expressão de moléculas inibitórias do ponto de controle imunológico, induzindo células imunes, estromais e tumorais (OKWAN-DUODU ET AL., 2013; ÖHLUND; ELYADA & TUVESON, 2014; PINTER & JAIN, 2017).

Evidências consideráveis sugerem que a sinalização ATII/ATIIR1 promove a angiogênese mediada por VEGF em tumores sólidos. Isso leva a alterações na densidade de microvasos e na indução da hiperpermeabilidade vascular, uma das principais características da vasculatura tumoral anormal. A perfusão prejudicada e a condição hipóxica dos tumores podem ser agravadas pela vasoconstrição induzida por ATII e aumento da resistência vascular (PINTER & JAIN, 2017; OOSTHUIZEN & STURROCK, 2022).

Outra ação pela qual o SRA favorece um microambiente imunossupressor é a promoção da inflamação relacionada ao câncer. A sinalização ATII/ATIIR1 pode aumentar a produção e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias em células tumorais e estromais. Os fibroblastos representam um alvo principal do SRA e desempenham um papel fundamental na manutenção de uma resposta inflamatória. As citocinas liberadas de células tumorais e estromais após ativação de ATIIR1 por ATII incluem o fator de crescimento transformador β (TGF- β), IL-1 α , interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF, (ciclo-oxigenase 2) COX- 2 e proteína C reativa (PCR) (PINTER & JAIN, 2017; OOSTHUIZEN & STURROCK, 2022).

2.4 APLICABILIDADE CLÍNICA DOS INIBIDORES DO SRA NO CÂNCER

O ISRA é recomendado como agente anti-hipertensivo em pacientes com comorbidades, incluindo insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, diabetes ou doença renal crônica (MESSERLI ET AL., 2018). Os inibidores da ECA (IECA) reduzem a produção de ATII, levando à prevenção da sinalização nos receptores ATII; os bloqueadores da ATIIR1 (BRA), por sua vez, bloqueiam a sinalização da ATIIR1 (ALMUTLAQ et al., 2021).

Curiosamente, muitos estudos em animais sugeriram que a inibição do SRA poderia desempenhar um papel importante na prevenção do início e progressão do

câncer, afetando a proliferação celular, a angiogênese e a inflamação (AFSAR et al., 2021). Entretanto, resultados de estudos populacionais são controversos (SHEN et al., 2016, JIANG et al., 2016; AFSAR et al., 2021). Abaixo segue alguns estudos que avaliaram a relação entre o uso desses medicamentos e o câncer.

Matsushima-Otsuka e colaboradores (2017) estudaram o efeito da losartana, um bloqueador do receptor da angiotensina, em um modelo de tumor subcutâneo em camundongos. A losartana diminuiu o crescimento tumoral em 14% e 17% em tumores derivados das linhagens celulares HSC3 e HSC4, respectivamente. Em tumores derivados de HSC3, o 5-fluorouracil (5-FU) sozinho inibiu o crescimento do tumor em 40%. Em contraste, o co-tratamento com 5-FU e losartana inibiu o crescimento do tumor em 75%. Em tumores derivados de HSC4, o 5-FU sozinho inibiu o crescimento do tumor em 21%. Em contraste, o co-tratamento com 5-FU e losartana inibiu o crescimento do tumor em 87%. Esses dados sugerem que o sistema intracelular da angiotensina pode ser um alvo significativo para CCE de boca.

Li, Sun & Hu (2017) realizaram uma meta-análise para avaliar o efeito da terapia adjuvante de SRAA combinados com agentes quimioterápicos em pacientes com câncer de mama, pâncreas, gastrointestinal e pulmão. Um total de 2.436 pacientes de 7 estudos retrospectivos foram investigados e observou-se uma redução significativa na mortalidade geral em favor de agentes quimioterápicos em combinação com agentes ISRA, taxa de risco (HR) 0,80 (IC 95%: 0,69-0,92); houve diminuição significativa do risco de progressão da doença em favor dos quimioterápicos em combinação com esquemas ISRA, HR 0,79 (IC 95%: 0,66-0,94), em comparação com aqueles que usaram apenas quimioterápicos. A análise de subgrupo indicou que agentes à base de platina mais BRA/IECA poderiam aumentar significativamente o resultado de sobrevida (HR = 0,56; IC 95%: 0,38-0,82). Esses resultados sugerem que ISRA combinados com agentes quimioterápicos podem melhorar os resultados em pacientes com câncer de vários tipos.

Yoshida e colaboradores (2017) estudaram uma população acometida com câncer de bexiga onde foram avaliados os resultados oncológicos de pacientes tratados ou não com ISRA após a cirurgia. As taxas de sobrevida específica para câncer em 5 anos em pacientes que receberam e não receberam ISRA foram de 79,0 e 66,4%, respectivamente (P = 0,011). Da mesma forma, as taxas de sobrevida global em 5 anos foram 76,1 e 61,4%, respectivamente (P = 0,0097). Análises multivariadas

mostraram que o uso de ISRA foi um fator prognóstico independente para a sobrevivência específica do câncer (taxa de risco 0,47, $P = 0,036$) e para a sobrevida global (taxa de risco 0,36, $P = 0,022$). Os autores concluíram que ISRA reduziram significativamente os riscos de mortalidade geral e específica após cistectomia radical em pacientes com câncer de bexiga.

Wei e colaboradores (2019) avaliaram uma coorte retrospectiva de pacientes com câncer de pulmão em usuários e não usuários de ISRA. A sobrevida livre de doença dos usuários de BRA (10,7 vs. 6,7 meses, $p = 0,040$) e de IECA (12,9 vs 6,7 meses, $p = 0,021$) foram mais longos do que o grupo não usuários de ISRA, enquanto nenhuma diferença estatística foi mostrada entre os grupos de BRA e IECA. Foi concluído que o uso de ISRA é um fator positivo para o prognóstico de pacientes com câncer de pulmão. Portanto, é necessário avaliar ativamente o histórico médico, especialmente o uso de medicamentos anti-hipertensivos, em pacientes com esse câncer.

Asgharzadeh e colaboradores (2020) realizaram uma meta-análise a fim de explorar o potencial impacto clínico dos IECA/BRA no câncer renal. A taxa de risco para a relação entre o uso de BRA e a sobrevida do câncer renal indicou que os pacientes com câncer renal que usaram BRA tiveram uma diminuição da mortalidade do que os não usuários (HR 0,818, IC 95% 0,691-0,969, $p = 0,02$). Esta meta-análise demonstrou que o tratamento com ISRA pode melhorar a sobrevida e reduzir a mortalidade de pacientes com câncer renal.

Deng e colaboradores (2022) reuniram em uma meta-análise 37 estudos observacionais que avaliaram a relação do uso dos IECA e dos BRA com o câncer colorretal. Como resultado, encontraram que o uso desses foi associado a uma melhor sobrevida livre de progressão da doença (HR = 0,83; IC 95%: 0,72–0,95). Foi concluído que os pacientes que fizeram uso ISRA tiveram uma sobrevida livre de progressão mais longa.

Lee e colaboradores (2022) realizaram uma coorte retrospectiva a fim de comparar a incidência de câncer entre pacientes em uso de inibidores do SRA e outros medicamentos anti-hipertensivos. Um total de 166.071 pacientes nos bancos de dados de sete hospitais foram incluídos na análise final; 26.650 (16%) estavam no grupo de inibidores de ISRA e 139.421 (84%) no grupo de outros medicamentos anti-

hipertensivos. A meta-análise de toda a coorte mostrou uma menor incidência de ocorrência de câncer no grupo inibidor do ISRA (9,90 vs. 13,28 por 1.000 pessoas-ano; HR, 0,81; intervalo de confiança [IC] de 95%, 0,75–0,88) em comparação com aqueles em uso de outras drogas anti-hipertensivas. Os pacientes em uso de inibidores do ISRA apresentaram menor incidência de câncer em comparação com aqueles em uso de outras drogas anti-hipertensivas. Esses achados suportam a associação entre o uso de ISRA e a ocorrência de câncer.

Oh e colaboradores (2022) realizaram na Coreia do Sul uma pesquisa retrospectiva para estudar os efeitos dos inibidores do SRA em pacientes submetidos à cirurgia oncológica. Em 5.022 pares de população pareada por pontuação de propensão, a mortalidade em 5 anos foi significativamente menor no grupo inibidor de RAAS (11,4% vs. 7,4%, razão de risco [HR] 0,73, intervalo de confiança de 95% [IC] 0,64–0,83, $P < 0,001$) e a taxa de recorrência em 5 anos também foi menor para o grupo inibidor do RAAS (5,3% vs. 3,7%, HR 0,82, IC 95% 0,68–0,99, $P = 0,04$). Ao final, os autores sugeriram que a prescrição de inibidores de ISRA de acordo com as diretrizes atuais pode estar associada à melhora da mortalidade após a cirurgia oncológica.

2.5 EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DO SRA EM CCE DE CABEÇA E PESCOÇO

Embora o SRA tenha sido implicado na tumorigênese, como visto anteriormente, ainda há poucos dados que demonstrem a expressão desse sistema nos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os CCE de boca (YASUMATSU et al., 2004; FEATHERSTON et al., 2016; BAILLIE et al., 2016; HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; NALLAIAH et al., 2019; SILJEE et al., 2021).

Yasumatsu e colaboradores (2004) verificaram a supressão de ATII e investigaram o papel do perindopril (IECA) na angiogênese, através da expressão do VEGF, e no desenvolvimento do CCE de cabeça e pescoço *in vitro* e *in vivo* (animal). O tratamento com o medicamento suprimiu significativamente a produção de ATII *in*

vitro e inibiu a atividade de indução do promotor de VEGF. Nos estudos *in vivo*, o perindopril teve um efeito inibidor significativo no crescimento do tumor e reduziu a formação de vasos sanguíneos em torno. Esses resultados sugeriram que o perindopril tem potencial para inibir o crescimento tumoral devido à supressão da angiogênese induzida por VEGF *in vivo*. A angiotensina II pode ter um papel importante na carcinogênese, e a atividade antiangiogênica do perindopril é, pelo menos em parte, mediada pela inibição da angiotensina II.

Featherston e colaboradores (2016) avaliaram a expressão de componentes do SRA em subpopulações de células-tronco cancerígenas de CCE de boca moderadamente diferenciado. A imunohistoquímica mostrou que o PRR foi expresso pelas subpopulações de células-tronco cancerígenas dentro dos ninhos do tumor, no estroma peritumoral e no endotélio dos microvasos dentro do estroma peritumoral. ATIIR1 e ATIIR2 foram localizados nas subpopulações de células-tronco cancerígenas dentro dos ninhos tumorais e no estroma peritumoral, enquanto a ECA foi localizada no endotélio dos microvasos dentro do estroma peritumoral. Os achados da presença e localização desses componentes dentro do estroma peritumoral sugerem-os como um alvo terapêutico pela modulação do SRA.

Baillie e colaboradores (2016) investigaram a expressão de componentes do SRA em duas subpopulações de células-tronco cancerosas a partir de amostras de CCE de língua moderadamente diferenciado. Houve expressão citoplasmática de PRR por células dentro dos ninhos de tumor, no estroma e no endotélio dos microvasos dentro do estroma. A ECA foi expressa pelo endotélio dos microvasos dentro do estroma e células na periferia dos ninhos de tumor. ATIIR1 e ATIIR2 foram expressos por células dentro dos ninhos de tumor e no endotélio dos microvasos da região.

Hinsley e colaboradores (2017) conduziram, em cultura de células de CCE de cabeça e pescoço, um estudo a fim de avaliarem o papel da ATII local na patogênese desse câncer. Foi verificado a expressão aberrante de ATIIR1 e que seu ligante ATII foi capaz de estimular as células tumorais e fibroblastos do estroma oral a promoverem quimiotaxia e invasão celular. Os autores levantam a possibilidade de utilizar antagonistas do receptor ATIIR1 e/ou Ang 1-7 como novos agentes terapêuticos para CCE de cabeça e pescoço.

Ram e colaboradores (2017) pesquisaram a expressão de componentes do SRA em subpopulações de células-tronco cancerosas identificadas no CCE de lábio moderadamente diferenciado. A imunoistoquímica detectou a expressão de PRR, ATIIR1 e ATIIR2 nas células dentro dos ninhos tumorais e do estroma. ECA foi localizado nos microvasos dentro do estroma. Os autores relataram que a presença de ECA no endotélio dos microvasos dentro do estroma é consistente com relatos recentes de um fenótipo endotelial primitivo, sugerindo seu papel na regulação da transição epitelial para mesenquimal, influenciando a angiogênese

Matsushima-Otsuka e colaboradores (2018) investigaram o papel do SRA, especificamente de ATIIR2, na progressão do CCE de boca. Foi verificado imunoreatividade positiva para ATIIR2 nos núcleos das células epiteliais malignas e nas estromais, sendo superior nos casos em estágios avançados. Entretanto, não houve imunomarcagem em células epiteliais não neoplásicas e nem nas células estromais a elas associadas. Embora o papel preciso do ATIIR2 nuclear exija um exame mais aprofundado, esses dados sugeriram que o sistema intracelular de angiotensina pode ser um alvo significativo para CCE de boca.

Nallaiah e colaboradores (2018) avaliaram a expressão dos componentes do SRA: PRR, ECA, ATIIR1 e ATIIR2 em subpopulações de células tronco de CCE cutâneo moderadamente diferenciado de cabeça e pescoço. Eles encontraram que PRR, ECA, ATIIR1 e ATIIR2 são expressos pelas subpopulações de células tronco cancerosas dentro dos ninhos tumorais, no estroma peritumoral e no endotélio dos microvasos.

Siljee e colaboradores (2021) verificaram a expressão de componentes do SRA por subpopulações de células-tronco cancerosas em CCE cutâneo metastático de cabeça e pescoço. A coloração imunohistoquímica demonstrou expressão do PRR, do ECA e do ATIIR2 em todos os casos e angiotensinogênio em 14 casos; no entanto, renina e ECA2 não foram detectados em nenhuma das 20 amostras de tecido de carcinoma epidermóide cutâneo metastático de cabeça e pescoço. Os autores sugeriram que a localização da ECA no endotélio dos microvasos do tumor poderia ter um papel na vasculogênese, refletindo o 'mimetismo vascular'. Além disso, a ECA poderia atuar regulando a transição epitelial-mesenquimal, um aspecto central da progressão do câncer e uma parte essencial da metástase

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunoistoquímica da ECA1 e 2 em CCE de boca, comparando-as com a expressão em mucosas orais sadias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os dados clínico-patológicos e histopatológicos dos casos de CCE de boca selecionados para o estudo;
- Avaliar a expressão da ECA1 e 2 no parênquima e nos componentes do estroma das lesões de CCE de boca;
- Verificar a associação entre a gradação histológica do CCE de boca e a expressão da ECA1 e 2;
- Correlacionar a associação entre a localização do CCE de boca e a expressão da ECA1 e 2.
- Investigar a associação entre a expressão da ECA1 e 2 no parênquima com a expressão nos componentes do estroma das lesões de CCE de boca;
- Verificar a associação entre o status do tecido (sadio ou patológico) com a expressão imunoistoquímica da ECA 1 e 2.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, pertencente a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CAE: 56085622.0.0000.5208, Número do Parecer: 5.336.975).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E POPULAÇÃO

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo baseado na análise de dados clínico-patológicos e imunohistoquímicos de CCE de boca diagnosticados no Laboratório de Patologia Oral da UFPE.

4.3 AMOSTRA

O estudo foi realizado com uma amostra não probabilística de conveniência, constituída por 40 espécimes que foram fixados em formol a 10% e incluídos em blocos de parafina. Destes, 10 eram CCE de boca bem diferenciados, 10 CCE de boca moderadamente diferenciados, 10 CCE de boca pobremente diferenciados e 10 casos de mucosa oral sadia.

4.3.1 Seleção da amostra

Os casos diagnosticados como CCE de boca foram selecionados no banco de dados do Laboratório de Patologia Oral da UFPE. Para confirmação do diagnóstico e determinação do grau de diferenciação celular do tumor (gradação histológica), os blocos de parafina de todos os casos foram separados e novos cortes histológicos

corados em Hematoxilina Eosina (HE) foram confeccionados. A revisão foi realizada por um patologista oral experiente.

A análise histopatológica e a gradação basearam-se na classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, com base no grau de diferenciação celular. Os tumores foram classificados da seguinte forma: bem diferenciados, quando apresentaram arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso; moderadamente diferenciados, quando apresentaram algum grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, e pouca queratinização; e pobremente diferenciadas, quando apresentaram predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima queratinização (EL-NAGGAR et al., 2017). Dos casos revisados, as 10 amostras de melhor qualidade de cada grau de diferenciação celular foram selecionadas para a análise imunoistoquímica. As amostras com material insuficiente ou de baixa qualidade foram excluídos do estudo.

Para representar a mucosa oral sadia, foram avaliadas as áreas de tecido normal adjacentes à Hiperplasias Fibrosas. Os trinta últimos casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Oral da UFPE e corados em HE foram separados e analisados. A revisão foi realizada por um patologista oral experiente. Como critérios de inclusão, todas as amostras precisavam apresentar epitélio íntegro e tecido conjuntivo subjacente com um mínimo infiltrado inflamatório. Dos casos revisados, as 10 amostras de melhor qualidade foram selecionadas para a análise imunoistoquímica.

4.3.2 Dados clínicos da amostra

Após seleção da amostra, foram coletados os dados referentes aos pacientes (idade, sexo, ocupação e exposição a hábitos deletérios – cigarro e/ou álcool). Quanto às características clínicas, foram avaliados tamanho, aspecto clínico, localização, tempo de evolução, sintomatologia, bem como as hipóteses de diagnóstico e o tipo de biópsia realizada. Os aspectos clínicos dos CCE de boca foram classificados em oito grupos: intraóssea, úlcera, leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, e lesões que apresentavam componente ulcerado com áreas ou de leucoplasia, ou de eritroplasia ou de eritroleucoplasia.

4.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.4.1 Método imunoistoquímico

Para as reações e análises imunoistoquímicas, foram realizados ensaios imunoistoquímicos para detecção de ECA1 e 2 utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase

A amostra selecionada, previamente fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes de 4 μ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (Starfrost®, Knittelglass, Glher, Alemanha) e levados à estufa a 60°C permanecendo por 24 horas para melhor adesão do tecido. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série graduada de álcool. Secções de tecido de rim e fígado humano foram usadas como controle positivo para a expressão de ECA1 e ECA2, seguindo as normas do fabricante dos anticorpos. Todas as etapas a serem descritas foram seguidas de uma lavagem durante 5 minutos em solução salina tamponada com Tris (Whash Buffer), pH 7,6 (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA).

A recuperação antigênica foi feita utilizando tampão citrato pH 6,0 (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) no banho-maria a 96°C durante 20 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 0,3% com azida de sódio e Levamisol incubado por 10 minutos em temperatura ambiente (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). Subsequentemente, as secções de tecido foram secas e incubadas com os anticorpos primários Anti-ECA1 Rabbit (nº de cat. AB28311UG100, Abcam, Cambridge, CB, Reino Unido) e Anti-ECA2 Mouse (nº de cat. AB89111UG100, Abcam, Cambridge, CB, Reino Unido) em solução diluente (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) numa diluição de 1:100 em overnight a 4°C. As secções de controle negativo foram incubadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) no lugar do anticorpo primário.

No dia seguinte, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (Dako EnVision® FLEX-HRP, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) por 1 hora em temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) por 8 minutos e contracorada com hematoxilina de Harris por 10 minutos à temperatura ambiente. As secções de tecido foram então reidratadas, imersas em xileno e uma lamínula com um meio de montagem em gotas foi colocada sobre as lâminas.

4.4.2 Análise Imunoistoquímica

Todas as lâminas foram escaneadas e digitalizadas pelo equipamento Panoramic MIDI® II automatic digital slide scanner (3DHistech®, Ltd., Budapest, Hungary) e analisadas pelo programa CaseViewer® (3DHistech®, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary) utilizando aumento total de até 400x.

As lâminas digitalizadas foram analisadas por um avaliador com experiência, previamente calibrado e de maneira cega quanto ao grau de diferenciação celular do tumor. Para calibração, o avaliador foi treinado por um patologista oral experiente apontando as alterações microscópicas que foram avaliadas. Eventuais dúvidas na avaliação foram solucionadas pela consulta ao patologista oral que realizou o treinamento.

A análise da expressão imunoistoquímica de ECA1 e 2 utilizada foi adaptada da metodologia proposta por Allawi, N. & Abdullan, B., 2022, consistindo em um sistema de pontuação semiquantitativo que analisa a porcentagem de células positivas e a intensidade de coloração delas. A pontuação da porcentagem de células positivas foi calculada como 0 (0%-10%), 1 (10%-25%), 2 (25%–50%), 3 (50%–75%) e 4 (>75%). Já a pontuação da intensidade da coloração foi calculada como 0 (sem coloração), 1 (coloração marrom claro), 2 (coloração marrom) e 3 (coloração marrom escuro). Ao final, a pontuação da expressão foi realizada multiplicando a pontuação da porcentagem celular positiva pela pontuação da intensidade de coloração para calcular o índice de coloração (IC). O IC foi calculado separadamente para o parênquima/epitélio de revestimento e para cada componente do estroma/tecido

conjuntivo subjacente. Uma pontuação de 4 ou menos foi considerada expressão fraca, enquanto uma pontuação de 6 ou mais indicava expressão forte.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram digitados em planilhas eletrônicas no programa Excel (Microsoft Office 365®) e exportados para o programa Statistical Package for the Social Sciences (versão 22.0.0.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas. As análises estatísticas descritivas em números absolutos e frequências relativas foram obtidas para caracterizar a amostra quanto aos aspectos clínicos e histológicos.

Quanto a estatística analítica, nas amostras de CCE de boca o Teste t de Student para amostras pareadas foi utilizado para comparar a média dos IC obtida nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo que expressaram a ECA1 com a média dos IC que expressaram ECA2. Nas amostras de tecido sadio foi utilizado o teste de Wilcoxon para a mesma comparação.

A análise de variância (ANOVA) de uma via (para os grupos nos quais os escores de IC estavam normalmente distribuídos) ou o teste de Kruskal-Wallis (para os grupos nos quais os escores de IC não estavam normalmente distribuídos) foi utilizado para avaliar o efeito do grau de diferenciação celular do tumor e da localização do tumor sobre as médias dos IC obtidos nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo que expressaram a ECA1 e/ou a ECA2. Quando observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, adicionalmente foi realizado o pós-teste (correção) de Bonferroni. O teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni também foi usado para avaliar o efeito do status do tecido (normal versus neoplásico maligno) sobre as médias dos IC obtidos nas amostras de tecidos sadios e nas amostras de tecidos neoplásicos malignos.

O coeficiente de correlação Pearson foi usado para analisar a correlação entre a expressão da ECA1 e da ECA2 nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo das amostras de CCE de boca. Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DA AMOSTRA

Os CCE de boca avaliados ocorreram predominantemente no sexo masculino (n=19-63,3%), com média de idade de 60 anos (mínimo de 30 anos, máximo de 83 anos e desvio padrão de $\pm 13,09$).

A língua foi o local mais prevalente (n=12-40%), seguida do assoalho de boca (n=6-20%). O tempo de evolução relatado foi em média 5 meses (mínimo de 1 mês, máximo de 2 anos e desvio padrão de $\pm 5,03$). Clinicamente, as lesões eritroleucoplásicas (n=8-26,7%) foram as mais comumente observadas, seguidas das úlceras (n=5-16,7%). As lesões tinham em média 2,5cm de tamanho (desvio padrão de $\pm 1,12$), variando 0,5cm a 5cm. Quanto a sintomatologia, 83,4% dos pacientes eram sintomáticos e apenas 13,3% assintomáticos. A principal hipótese clínica foi de CCEs de boca (n=26-86,6%). As outras hipóteses levantadas foram leucoplasia, osteossarcoma, linfoma e tuberculose.

Em relação à ocupação dos pacientes, a maioria era aposentado (n=12-50%), seguido de donas de casa (n=5-20,8%) e agricultores (n=3-12,5%). Apenas 8 prontuários relataram exposição aos principais fatores de risco (tabaco e álcool). Desses, 4 eram expostos cronicamente ao tabaco e 4 ao tabaco e ao álcool.

As amostras de tecido utilizadas para o estudo eram predominantemente oriundas de biópsia incisional (n=21-70%). Os dados demográficos e clínicos estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos e clínicos e ocupação dos pacientes da amostra com Carcinoma de Células Escamosas de boca

Variáveis	Número de casos	%
Sexo (n=30)		
Masculino	19	63,3
Feminino	11	36,7
Idade (n=30)		
<41 anos	3	10%
>41 anos	27	90%
Localização do tumor (n=30)		
Língua	12	40,0
Assoalho de boca	6	20,0
Mucosa Jugal	4	13,3
Rebordo alveolar/gengiva	4	13,3
Palato mole	4	13,3
Aspecto Clínica (n=30)		
Eritroleucoplasia	8	26,7
Úlcera	5	16,7
Leucoplasia	4	13,3
Úlcera com áreas de eritroplasia	4	13,3
Úlcera com áreas de eritroleucoplasia	4	13,3
Eritroplasia	3	10,0
Intraóssea	2	6,7
Ocupação (n=24)		
Aposentado	12	50,0
Dona de casa	5	20,8
Agricultor	3	10,0
Outros	4	19,2

Fonte: O autor (2023).

5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

5.2.1 Imunoexpressão da ECA1

A imunorreatividade positiva da ECA 1 foi encontrada em todos os casos de CCE de boca. A marcação foi observada, em porcentagens e intensidades diferentes, no citoplasma das células do parênquima, nas ilhas de células malignas que invadiram o tecido conjuntivo, além dos fibroblastos, vasos sanguíneos, nervos periféricos, fibras musculares esqueléticas e tecido glandular presentes no estroma tumoral.

Quando avaliada a marcação positiva da enzima no parênquima tumoral, foi constatado que em 13 casos (43,3%) houve uma porcentagem de células positivas entre 50% e 75% e em 14 (46,7%) maior que 70%. A intensidade de coloração mais prevalente foi a forte, presente em 21 casos (70%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 27 (90%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Figuras 1A E 1B) (Tabela 2).

Quanto aos componentes estromais, houve imunorreatividade positiva em fibroblastos numa porcentagem entre 50% e 75% em 21 casos (70%). A intensidade de coloração mais comumente encontrada foi a forte, presente em 21 casos (70%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 26 (86,6%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Figura 1C) (Tabela 2).

Nos vasos sanguíneos, houve imunorreatividade numa porcentagem acima de 75% em 22 casos (73,3%) e intensidade de coloração forte em 22 casos (73,3%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 28 (93,3%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Figura 1D) (Tabela 2).

Em 19 casos de CCE de boca havia a presença de fibras musculares esqueléticas. Dentre esses, em 11 (57,9%) houve uma porcentagem entre 50% e 75% de fibras positivas para ECA1. A intensidade de coloração predominante foi a forte (n13-68,4%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 18 (94,7%) CCEs de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Figura 1E) (Tabela 2).

Nervos periféricos estavam presentes em 14 amostras de CEC de cavidade oral, onde 8 (57,1%) tiveram imunorreatividade positiva em uma porcentagem entre 50% e 75% e intensidade de coloração forte. Como resultado da porcentagem e da intensidade, 12 (85,7%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Tabela 2).

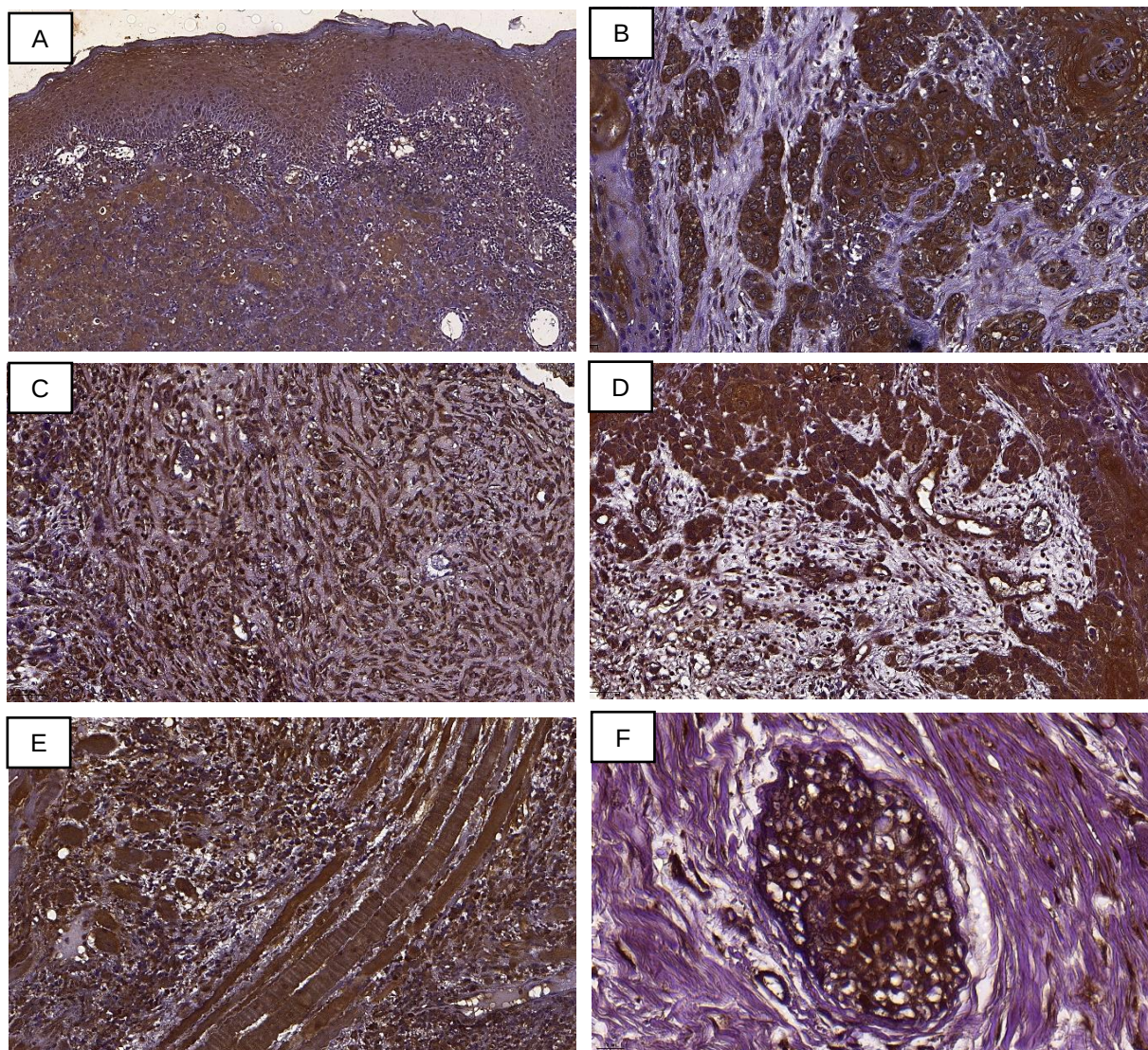
Tecidos glandulares foram encontrados em 9 amostras. Dessas, 1 (11,1%) apresentou imunorreatividade negativa a ECA1. Das amostras com imunorreatividade positiva, em 4 (44,4%) houve uma porcentagem entre 50% e 75% em células acinares

e ductais. Quatro casos (44,4%) tiveram uma intensidade de coloração do tipo forte. Como resultado da porcentagem e da intensidade, 5 (55,6%) CCEs de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA1 (Tabela 2).

A imunorreatividade para a ECA1 foi negativa em todos os casos de mucosa oral saudável.

Tecidos humanos usados como controles positivos para coloração imunoistoquímica mostraram o padrão de coloração esperado para ECA1 no rim e no fígado humano. Os controles negativos de tecido mostraram coloração negativa apropriada e confirmaram a especificidade do anticorpo primário.

Figura 1 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-1 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células do parênquima tumoral positivas para ECA-1 (100x). (B) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-1 (200x). (C) Fibroblastos positivos para ECA-1 (200x). (D) Endotélio vascular positivo para ECA-1 (200x). (E) Fibras musculares positivas para ECA-1 (200x). (F) Nervo periférico positivo para ECA-1 (400x).



Fonte: O autor (2023)

5.2.2 Imunoexpressão da ECA 2

A imunorreatividade positiva da ECA2 foi encontrada em 17 (56,7%) casos de CCE de boca. A coloração foi observada, em porcentagens e intensidades diferentes, no citoplasma das células do parênquima tumoral, nas ilhas de células malignas que invadiram o tecido conjuntivo, além dos vasos sanguíneos, nervos periféricos, fibras musculares esqueléticas e glândulas salivares presentes no microambiente tumoral. Entretanto, nenhuma das amostras apresentou imunorreatividade em fibroblastos (Figura 2C).

Quando avaliada a marcação positiva da enzima nas células do parênquima tumoral, foi constatado que em 08 casos (26,7%) houve uma porcentagem de células positivas entre 50% e 75% e em nenhum caso foi maior que 75%. A intensidade de coloração mais prevalente foi a fraca, presente em 9 casos (30%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 10 (33,3%) CCEs de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou inferior a 4, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Figuras 2A E 2B) (Tabela 2).

Quanto aos componentes estromais, houve imunorreatividade positiva nos vasos sanguíneos em 10 casos (33,3%). Em 4 casos (13,3%) a porcentagem de vasos sanguíneos marcados foi de 50% a 75%. A intensidade de coloração prevalente foi a moderada, presente em 7 casos (23,3%). Como resultado da porcentagem e da intensidade, 6 (20%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou inferior a 4, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Figura 2D) (Tabela 2).

Em 19 casos de CCE de boca havia a presença de fibras musculares esqueléticas e apenas 5 expressaram a ECA2. Em 3 (14,3%) houve uma porcentagem entre 25% e 50% de fibras positivas. As intensidades de coloração mais prevalente foi a moderada, com 3 casos (14,3%) cada. Como resultado da porcentagem e da intensidade, 3 (14,3%) CCE de boca apresentaram, nesse componente, IC igual ou inferior a 4, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Figura 2E) (Tabela 2).

Nervos periféricos estavam presentes em 14 amostras de CCE de boca. Porém, somente 4 casos expressaram a ECA2. Três casos (20,0%) tiveram imunorreatividade positiva numa porcentagem entre 25% e 50%. As intensidades de coloração encontradas foram a fraca e a moderada, com 2 casos (13,3%) cada. Como resultado da porcentagem e da intensidade, 3 (20,0%) CCE de boca

apresentaram, nesse componente, IC igual ou inferior a 4, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Figura 2F) (Tabela 2).

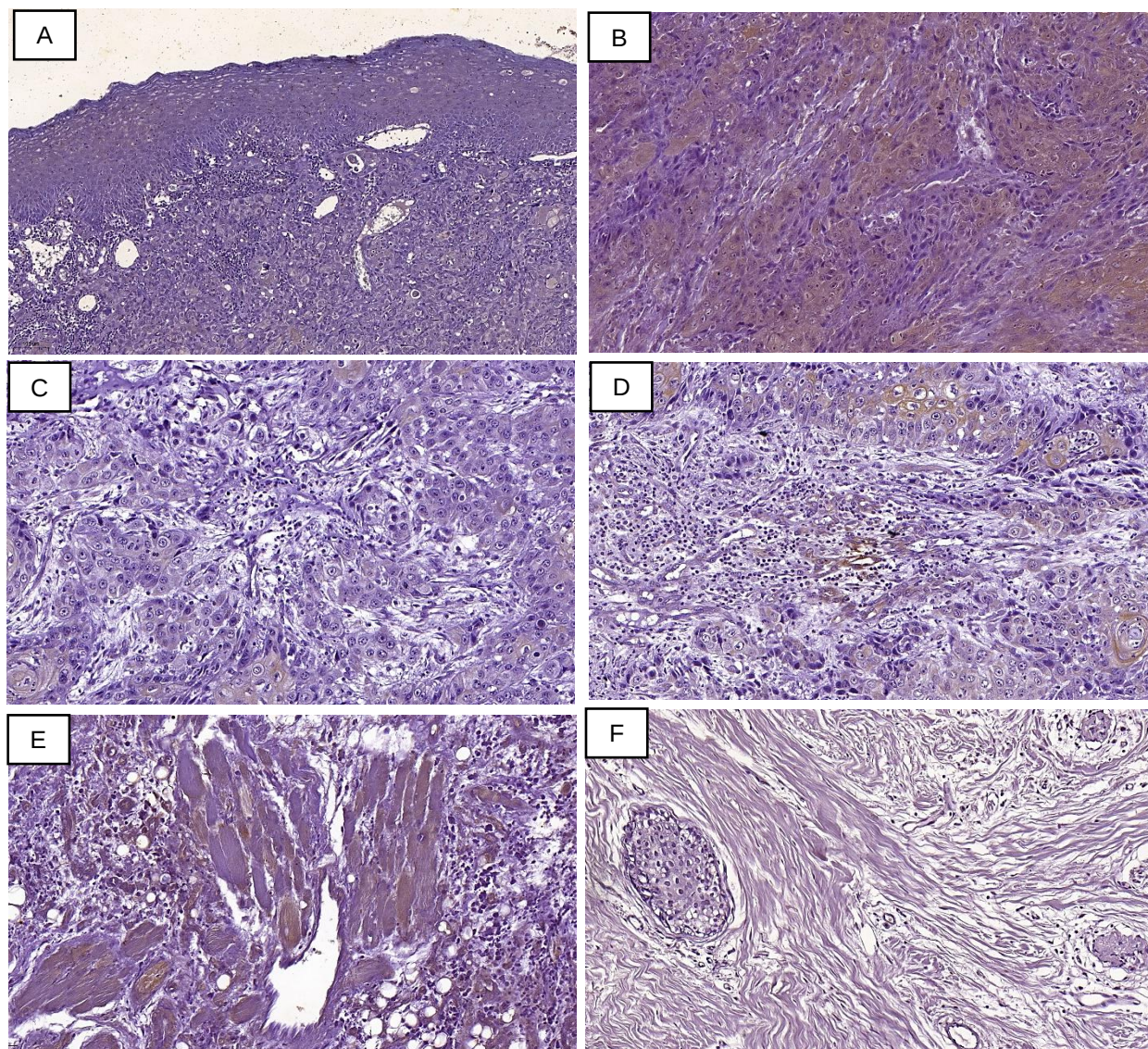
Tecidos glandulares foram encontrados em 9 amostras. Dessas, 1 (12,5%) apresentou imunorreatividade positiva para a ECA2. A proporção de células marcadas foi entre 50% e 75% em células acinares e ductais e intensidade de coloração do tipo fraca. Como resultado da proporção e da intensidade, nesse componente, o IC foi de 3, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Tabela 2).

A imunorreatividade positiva da ECA2 foi encontrada em todos os casos de mucosa oral saudável. A coloração foi observada, em porcentagens e intensidades diferentes, no citoplasma das células do epitélio de revestimento, nos vasos sanguíneos e nas fibras musculares esqueléticas presentes no tecido conjuntivo subjacente. No epitélio, 5 (50%) amostras apresentaram imunorreatividade positiva em uma porcentagem entre 25% e 50%. A intensidade de coloração mais frequente foi a fraca (5-50%) e, como resultado, o IC em 7 amostras (70%) foi igual ou abaixo de 4, conferindo uma expressão fraca da ECA2 (Figura 3A).

No tecido conjuntivo, os fibroblastos foram negativos para a ECA2 em todos os casos (Figura 3B). Seis (60%) amostras apresentaram imunorreatividade positiva nos vasos sanguíneos em uma porcentagem entre 50% e 75%. A intensidade de coloração mais frequente foi a moderada (6-60%) e, como resultado, o IC em 8 amostras (80%) foi igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA2 (Figura 3C). Já nas fibras musculares esqueléticas, metade dos casos apresentaram esse componente para avaliação. Em 4 (40%) casos presentes, imunorreatividade para a ECA2 foi positiva em uma porcentagem entre 50% e 75%. A intensidade de coloração mais frequente foi a moderada (4-40%) e, como resultado, o IC em todas as amostras foi igual ou superior a 6, conferindo uma expressão forte da ECA2 (Figura 3D).

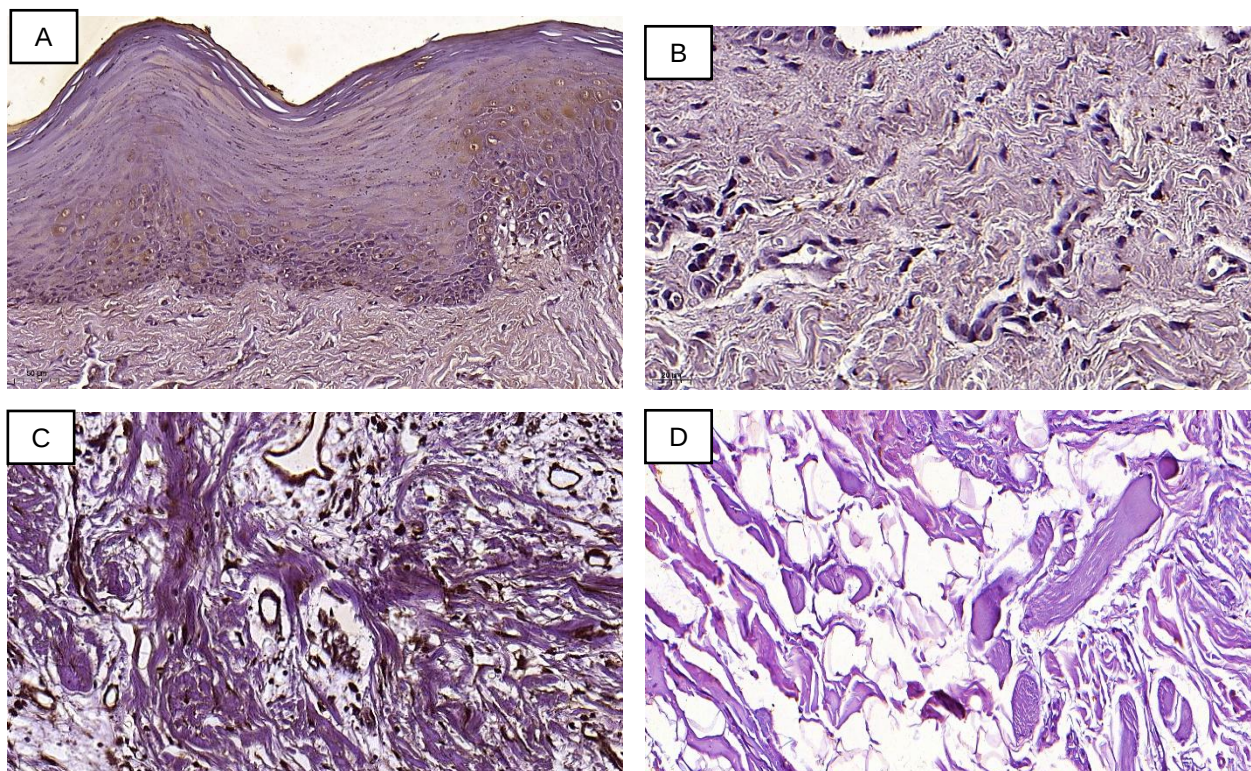
Tecido humano usado como controle positivo para marcação imunoistoquímica mostrar o padrão de coloração esperado para ECA2 no rim humano. O controle negativo de tecido mostrou coloração negativa apropriada e confirmou a especificidade do anticorpo primário.

Figura 2 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (100x). (B) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (200x). (C) Fibroblastos negativos para ECA-2 (200x). (D) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (E) Fibras musculares positivas para ECA-2 (200x). (F) Nervo periférico negativo para ECA-2 (200x).



Fonte: O autor (2023)

Figura 3 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de mucosa oral saudável (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais positivas para ECA-2 (100x). (B) Fibroblastos negativos para ECA-2 (400x) (C) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (D) Fibras musculares negativas para ECA-2 (200x).



Fonte: O autor (2023)

Tabela 2 – Resultados da expressão imunoistoquímica da ECA1 e da ECA 2 nas amostras de Carcinoma de Célula Escamosas de boca.

Variáveis	Parênquima				Estroma							
			Fibroblastos		Vasos sanguíneos		Fibras musculares esqueléticas		Nervos periféricos		Tecido glandular	
	ECA1 n*=30	ECA2 n*=30	ECA1 n*=30	ECA2 n*=30	ECA1 n*=30	ECA2 n*=30	ECA1 n*=19	ECA2 n*=19	ECA1 n*=14	ECA2 n*=14	ECA1 n*=9	ECA2 n*=9
Porcentagem de células positivas												
Ausência de marcação	-	43,3%	-	100%	-	66,7%	-	66,7%	-	73,3%	11,1%	87,5%
10% a 25%	-	6,7%	3,3%	-	3,3%	10,0%	5,3%	-	7,1%	-	-	-
25% a 50%	10%	23,3%	13,3%	-	-	10,0%	-	14,3%	-	20,0%	11,1%	-
50% a 75%	43,3%	26,7%	73,3%	-	23,3%	13,3%	57,9%	9,5%	57,1%	6,7%	44,4%	12,5%
>75%	46,7%	-	10%	-	73,3%	-	36,8%	-	35,7%	-	33,3%	-
Intensidade de coloração												
Ausência de marcação	-	43,3%	-	100%	-	66,7%	-	66,7%	-	73,3%	11,1%	88,9%
Fraca intensidade	10%	30,0%	10%	-	6,7%	10,0%	5,3%	9,5%	6,7%	13,3%	33,3%	11,1%
Moderada intensidade	20%	26,7%	20%	-	20	23,3%	26,3%	14,3%	28,6%	13,3%	11,1%	-
Forte intensidade	70%	-	70%	-	73,3	-	68,4%	-	57,1%	-	44,4%	-
Índice de coloração												
0	-	43,3%	-	100%	-	66,7%	-	66,7%	-	73,3%	11,1%	87,5%
1	-	6,7%	3,3%	-	-	10,0%	5,3%	-	7,1%	-	-	-
2	3,3%	20,0%	3,3%	-	3,3%	-	-	9,5%	-	13,3%	-	-
3	6,7%	3,3%	3,3%	-	3,3%	-	-	-	-	-	33,3%	12,5%
4	-	3,3%	3,3%	-	-	10,0%	-	4,8%	7,1%	6,7%	-	-
6	16,7%	23,3%	23,3%	-	6,7%	13,3%	21,1%	9,5%	14,3%	6,7%	-	-
8	10%	-	-	-	13,3%	-	5,3%	-	14,3%	-	11,1%	-
9	26,7%	-	53,3%	-	13,3%	-	36,8%	-	42,9%	-	22,2%	-
12	36,7%	-	10%	-	60%	-	31,6%	-	14,3%	-	22,2%	-

*Corresponde ao número de casos que apresentavam o componente para avaliação

Fonte: O autor (2023)

5.2.3 Análise comparativa da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2

O Teste t para amostras pareadas revelou, nas amostras de CCE de boca, que houve diferença significativa entre as médias dos IC das células do parênquima tumoral imunopositivas para a ECA1 comparada a ECA2, com uma maior média de imunoexpressão para ECA1 ($t(29)=10,47$; $p<0,001$). A mesma análise foi realizada para comparar as médias dos IC dos componentes do estroma. Verificou-se que somente o componente “tecido glandular” não apresentou diferença significativa na imunoexpressão entre ECA1 e ECA2 ($t(8)=2,42$; $p=0,60$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Teste t comparando as médias dos IC das expressões imunoistoquímicas da ECA1 e da ECA2 nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas de boca.

Fonte: O autor (2023)

Variáveis	Medidas						Teste t		
	ECA1			ECA2			t	Gl	p
	Média	DP	N	Média	DP	N			
Parênquima	8,86	3,03	30	2,10	2,42	30	10,47	29	<0,001
Fibroblasto	7,73	2,72	30	0,00	0,00	30	15,52	29	<0,001
Vasos sanguíneos	10,03	2,85	30	1,30	2,23	30	15,45	29	<0,001
Músculo esquelético	9,29	2,36	19	1,17	2,12	19	11,93	18	<0,001
Nervo periférico	8,45	2,42	14	0,90	1,86	14	11,11	13	<0,001
Tecido glandular	4,33	3,44	9	0,50	1,22	9	2,42	8	0,060

Nas amostras de tecido saudável, o Teste de Wilcoxon revelou que houve diferença significativa entre as médias dos IC das células do revestimento epitelial imunopositivas para a ECA1 comparada a ECA2, com uma maior média de imunoexpressão em ECA2 ($Z=-2,84$; $p=0,004$). A mesma análise foi realizada para comparar as médias do IC dos vasos sanguíneos, verificando-se uma diferença significativa na imunoexpressão em ECA1 comparada a ECA2, com maior média em ECA2 ($Z=-2,82$; $p=0,005$). Para o componente muscular, não houve diferença entre as médias do IC das fibras musculares esqueléticas ($Z=-1,41$; $p=0,157$).

5.2.4 Análise da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 segundo o grau de diferenciação celular do tumor

A análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste de Kruskal-Wallis demonstraram existir efeito do grau de diferenciação celular do tumor sobre a média dos IC obtidos nas células do parênquima tumoral e nos componentes do estroma que expressaram a ECA1.

Sobre a ANOVA de uma via, o teste mostrou que existe efeito do grau histológico sobre a média dos IC obtidos nas células do parênquima tumoral [$F(2, 27)=8,707$; $p<0,001$] e sobre a média dos IC obtidos nos tecidos glandulares [$F(2, 6)=7,96$; $p=0,02$] que expressaram positivamente a ECA1. O post-hoc de Bonferroni mostrou que em média o IC do grupo Bem Diferenciado é menor que IC dos grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado (Tabela 4).

O teste de Kruskal-Wallis revelou que há efeito do grau histológico sobre a média dos IC obtidos nos fibroblastos [$X^2(2) = 11,576$; $p=0,003$], nos vasos sanguíneos [$X^2(2) = 14,337$; $p=0,001$] e nos nervos periféricos [$X^2(2) = 7,316$; $p=0,026$] que expressaram positivamente a ECA1. O pós-teste mostrou que em média o IC do grupo Bem Diferenciado é menor que IC dos grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado. Em relação ao efeito sobre as fibras musculares esqueléticas, o grau histológico não influenciou na média dos IC obtidos [$X^2(2) = 5,176$; $p=0,075$] (Tabela 4).

A expressão da ECA2 no parênquima e no estroma tumoral não foi influenciada pela gradação histológica do CCE de boca.

Tabela 4 - Análise da imunoexpressão da ECA1 segundo o grau de diferenciação celular nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas de boca

Variáveis	Grau de diferenciação celular			Valor de <i>p</i>
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrememente diferenciado	
Parênquima (n=30)	6,30 ± 3,09	9,6 ± 2,36	10,70 ± 1,70	<0.001*
Fibroblasto (n=30)	5,40 ± 2,67	8,70 ± 1,70	9,10 ± 2,18	0,003**
Vasos sanguíneos (n=30)	7,30 ± 3,26	11,40 ± 1,26	11,40 ± 1,26	0,001**
Músculo esquelético (n=19)	7,12 ± 3,60	9,75 ± 1,50	10,28 ± 1,60	0,075**
Nervo periférico (n=14)	5,66 ± 2,87	9,00 ± 0,00	9,83 ± 1,72	0,026**
Tecido glandular (n=9)	3,40 ± 2,88	10,5 ± 2,12	10,5 ± 2,12	<0.001*

*Anova de uma via ** Kruskal-Wallis

Fonte: O autor (2023)

O Teste de Kruskal-Wallis determinou haver efeito do status do tecido (sadio ou neoplásico maligno) sobre a média dos IC obtidos nas células epiteliais que expressaram positivamente a ECA1 [$X^2(3) = 23,889$; $p < 0,001$] e a ECA2 [$X^2(3) = 15,523$; $p = 0,001$], sobre a média dos IC obtidos nos vasos sanguíneos que expressaram positivamente a ECA1 [$X^2(3) = 19,533$; $p < 0,001$] e a ECA2 [$X^2(3) = 11,741$; $p = 0,008$] e sobre a média dos IC obtidos nos fibroblastos que expressaram positivamente a ECA1 [$X^2(3) = 29,980$; $p < 0,001$].

O pós-teste mostrou que em média, nos casos positivos para a ECA1, o IC do grupo Tecido sadio foi menor que o IC dos grupos Bem Diferenciado, Moderadamente Diferenciado e Pobrememente diferenciado. Já nos casos positivos para a ECA2, o pós-teste mostrou que em média o IC para o componente epitelial do grupo Tecido sadio é menor que o IC para o componente epitelial dos grupos Moderadamente Diferenciado e Pobrememente diferenciado, tanto para o componente epitelial quando para os componentes do tecido conjuntivo

5.2.5 Análise da imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 segundo o a localização do tumor

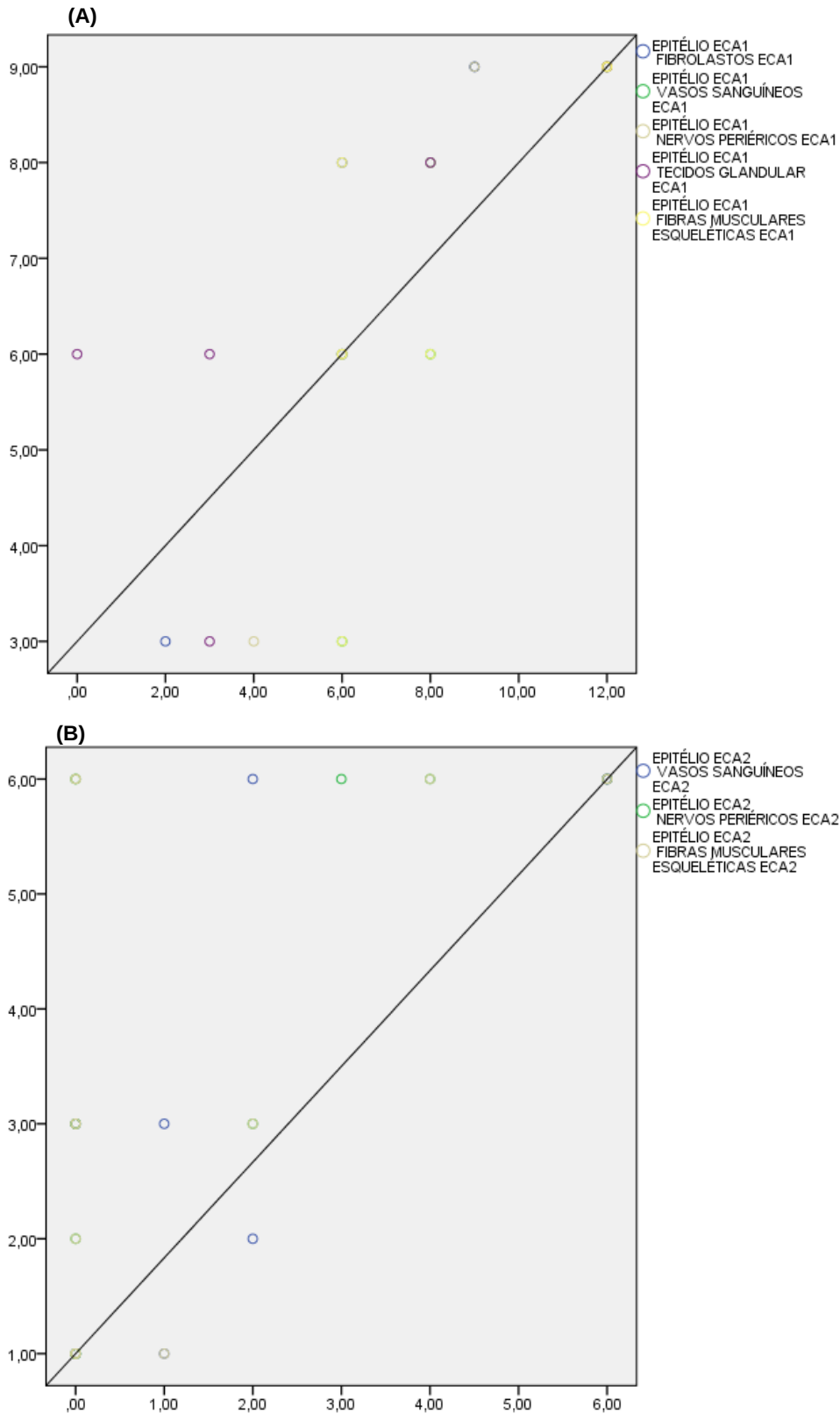
A análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste de Kruskal-Wallis demonstraram não haver efeito da localização do tumor sobre a média dos IC obtidos nas células do parênquima tumoral e nos componentes do estroma que expressaram a ECA1 ($p>0,05$) e ECA2 ($p>0,05$).

5.2.6 Correlação entre a imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 no parênquima com a imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 nos componentes do estroma subjacente

A correlação de Pearson mostrou que a imunoexpressão da ECA1 nas células do parênquima tumoral foi positivamente relacionada, de maneira forte, com a imunoexpressão da ECA1 nos fibroblastos ($r=0,822$; $p<0,001$), nos vasos sanguíneos ($r=0,831$; $p<0,001$), nos nervos periféricos ($r=0,830$; $p<0,001$) e nos tecidos glandulares ($r=0,731$; $p=0,025$). Sobre as fibras musculares esqueléticas, a correlação foi positiva e moderada ($r=0,697$; $p=0,001$). Essas relações são demonstradas como uma linha reta inclinada para cima na Figura 4(A).

Notavelmente, a expressão da ECA2 nas células do parênquima tumoral também foi positivamente relacionada, de maneira forte, com a imunoexpressão da ECA2 nos vasos sanguíneos ($r=0,872$; $p<0,001$) e de maneira moderada com os nervos periféricos ($r=0,534$; $p=0,040$) e fibras musculares esqueléticas ($r=0,600$; $p=0,004$). No que se refere aos tecidos glandulares, a correlação foi negativa e fraca ($r=-0,359$; $p=0,383$). Essas relações são demonstradas como uma linha reta inclinada para cima na Figura 4(B).

Figura 4 – Diagrama de dispersão mostrando a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nas células epiteliais malignas contra a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nos componentes do estroma subjacente.



Fonte: O autor (2023)

6 ARTIGO - O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS CONVERSoras DA ANGIOTENSINA (ECA)-1 E 2

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo, gerando um grande impacto na economia e na saúde (FENG et al., 2020). Os carcinomas de células escamosas (CCE) de boca representam a 16ª neoplasia maligna mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 377.713 novos diagnósticos e 177.757 novos óbitos estimados para o ano de 2020 (FEATHERSTON et al., 2016; SUNG et al., 2021; GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020). No Brasil, o número de novos casos esperados, para cada ano do triênio 2023-2025, é de 15.100, sendo o 5º tipo mais comum entre os homens (INCA, 2022).

Apesar dos avanços no tratamento do CCE de boca, com destaque para a imunoterapia, a taxa de mortalidade permanece alta. Isso se deve a dificuldade de compreensão do perfil molecular desta doença (HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; CHATTERJEE, LASKAR & CHAUKAR, 2020; DHAR, VAISH & D'CRUZ, 2020; MIRANDA-FILHO & BRAY, 2020; HSU et al., 2020). Estudos indicam que o estroma tumoral desempenha um papel crítico na progressão do tumor, sugerindo que fatores desse ambiente podem representar alvos viáveis para uma nova geração de agentes terapêuticos (PRIME et al., 2017; PELTANOVA, RAUDENSKA & MASARIK, 2019; HSU et al., 2020).

Vários mecanismos parácrinos existentes nos tecidos locais já foram relacionados a tumorigênese. Um desses sistemas é o sistema renina-angiotensina (SRA), que existe localmente no tecido de vários órgãos, incluindo a mucosa oral, e o seu bloqueio pode fornecer uma alternativa no tratamento de tumores sólidos (HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; SILJEE et al., 2021).

O SRA é um importante sistema enzimático peptídico que resulta em efeitos sistêmicos, quando sintetizados nos tecidos. Dentre as funções sistêmicas se destacam os efeitos cardiovasculares, endócrinos e neuronais (NAKAMURA et al.,

2011; RAM et al., 2017). Estudos têm demonstrado evidências crescentes de que a desregulação do SRA leva a uma ampla gama de efeitos patológicos locais, incluindo o desenvolvimento e a progressão do câncer (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; NALLAIAH et al., 2019; YANG et al., 2021). A expressão alterada de vários componentes desse sistema foi demonstrada em tecidos patológicos, como hiperplasia mamária e neoplasias malignas de mama, pulmão, pâncreas, próstata, câncer de pele, glioblastoma multiforme e CCE de cabeça e pescoço, incluindo o de boca (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; LIU et al., 2012; PINTER & JAIN, 2017; NALLAIAH et al., 2019; YANG et al., 2021).

O eixo que envolve a Enzima Conversora de Angiotensina 1 (ECA1) parece atuar promovendo o crescimento do tumor por meio da modulação na angiogênese, proliferação celular, apoptose e inflamação, estando também envolvido em processos necessários para a metástase, como a regulação da célula para adesão celular, degradação de proteínas da matriz extracelular, migração e invasão (AGER et al., 2008; GEORGE, THOMAS & HANNAN, 2010; LIU et al., 2012; PINTER & JAIN, 2017; AFSAR et al., 2021). Por outro lado, o eixo da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) interage para antagonizar as ações da sua homóloga, a ECA1, através de uma variedade de mecanismos, incluindo inibição da proliferação celular, invasão e metástase e inibição da transição epitelial mesenquimal (PINTER & JAIN, 2017; NALLAIAH et al., 2019, AFSAR et al., 2021). Além disso, os componentes do SRA também são expressos em muitos tipos celulares do microambiente tumoral, como células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T (PINTER & JAIN, 2017).

Embora o SRA tenha sido implicado na tumorigênese, como visto anteriormente, ainda há poucos dados que demonstrem a expressão desse sistema nos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os CECs de cavidade oral (YASUMATSU et al., 2004; FEATHERSTON et al., 2016; BAILLIE et al., 2016; HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; NALLAIAH et al., 2019; SILJEE et al., 2021). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de ECA1 e ECA2 em amostras de CCEs de boca e em amostras de mucosas orais saudáveis.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal e retrospectivo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, sob protocolo no. 56085622.0.0000.5208.

Amostras de tecido

Inicialmente, todos os casos de CCEs de boca diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, entre 2000 e 2021, foram incluídos no estudo. Para confirmação do diagnóstico e determinação do grau de diferenciação celular do tumor novos cortes histológicos corados em Hematoxilina Eosina (HE) foram confeccionados. A análise histopatológica e a classificação foram realizadas de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017. Os tumores foram classificados em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados (EL-NAGGAR et al., 2017). As amostras com material insuficiente ou de baixa qualidade foram excluídos. Dos casos que restaram, as 10 amostras com melhor qualidade nos tecidos, para cada grau de diferenciação celular, foram selecionadas para a análise imunoistoquímica. Para representar o tecido oral sadio, foram avaliadas as áreas de tecido normal adjacentes à Hiperplasias Fibrosas que apresentavam epitélio íntegro e tecido conjuntivo com mínimo processo inflamatório. Dos casos revisados, as 10 amostras de melhor qualidade foram selecionadas para a análise imunoistoquímica.

Dos casos selecionados, foram coletados dados sociodemográficos e clínicos dos prontuários, incluindo sexo, idade, ocupação do paciente, sintomas relatados pelo paciente na consulta inicial, tempo de evolução, localização da amostra, aspecto clínico, tamanho, primeira hipótese diagnóstica e histórico de hábitos deletérios (tabagismo, etilismo ou ambos). Os aspectos clínicos dos CCEs de boca foram classificados em oito grupos: intraóssea, úlcera, leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, e lesões que apresentavam componente ulcerado com áreas ou de leucoplasia, ou de eritroplasia ou de eritroleucoplasia.

Imunoistoquímica

As amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram submetidas à cortes com 4µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (Starfrost®, Knittelglass, Glher, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série graduada de álcool. A recuperação antigênica foi feita utilizando tampão citrato com pH 6,0 em banho-maria a 96°C durante 20 minutos. Os tecidos foram lavados durante 5 minutos em solução salina tamponada com Tris (Whash Buffer), pH 7,6, antes de cada nova etapa. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi obtido pela incubação do tecido em uma solução de bloqueio composta por peróxido de hidrogênio a 0,3% por 10 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, as secções de tecido foram secas e incubadas com os anticorpos primários Anti-ECA1 Rabbit (nº de cat. AB28311UG100, Abcam, Cambridge, CB, Reino Unido) e Anti-ECA2 Mouse (nº de cat. AB89111UG100, Abcam, Cambridge, CB, Reino Unido) em solução diluente (Kit Dako EnVision® FLEX, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) numa proporção de 1:100 durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo secundário polimerizado à peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi revelada usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 8 minutos e contracorada com hematoxilina de Harris por 10 minutos à temperatura ambiente. As secções de tecido foram então reidratadas, imersas em xileno e uma lamínula com um meio de montagem em gotas foi colocada sobre as lâminas.

Para controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de rim e fígado humano. Para o controle negativo, no protocolo descrito anteriormente, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Todas as lâminas foram escaneadas e digitalizadas pelo equipamento Pannoramic MIDI® II automatic digital slide scanner (3DHistech®, Ltd., Budapest, Hungary) e analisadas pelo programa CaseViewer® (3DHistech®, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary) utilizando aumento total de até 400x.

A análise da expressão imunoistoquímica de ECA1 e 2 utilizada foi adaptada da metodologia proposta por Allawi, N. & Abdullan, B., 2022, consistindo em um

sistema de pontuação semiquantitativo que analisa a porcentagem de células positivas e a intensidade de coloração delas. A pontuação da porcentagem de células positivas foi calculada como 0 (0%-10%), 1 (10%-25%), 2 (25%–50%), 3 (50%–75%) e 4 (>75%). Já a pontuação da intensidade da coloração foi calculada como 0 (sem coloração), 1 (coloração marrom claro), 2 (coloração marrom) e 3 (coloração marrom escuro). Ao final, a pontuação da expressão foi realizada multiplicando a pontuação da porcentagem celular positiva pela pontuação da intensidade de coloração para calcular o índice de coloração (IC). O IC foi calculado separadamente para cada tipo celular. Uma pontuação de 4 ou menos foi considerada expressão fraca, enquanto uma pontuação de 6 ou mais indicava expressão forte.

Análise estatística

Os dados analisados foram tabulados e analisados no programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (versão 22.0.0.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As análises estatísticas descritivas em números absolutos e frequências relativas foram obtidas para caracterizar a amostra quanto aos aspectos clínicos e histológicos.

Para comparar a média dos IC obtida nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo que expressaram a ECA1 com a média dos IC que expressaram ECA2 foi utilizado o Teste t de Student para amostras pareadas. Para a mesma comparação, nas amostras de mucosa oral sadia, foi realizado o teste de Wilcoxon. Para grupos nos quais as médias dos IC foram normalmente distribuídas, a análise de variância (ANOVA) de uma via usada para avaliar o efeito do grau de diferenciação celular do tumor e da localização do tumor sobre as médias dos IC obtidos nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo que expressaram a ECA1 e/ou a ECA2. Para grupos em que as médias dos IC não foram distribuídos normalmente, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. Quando observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, adicionalmente foi realizado o pós-teste (correção) de Bonferroni. O teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni também foi usado para avaliar o efeito do status do tecido (normal versus neoplásico maligno) sobre as

médias dos IC obtidos nas amostras de tecidos saudáveis e nas amostras de tecidos neoplásicos malignos.

O coeficiente de correlação Pearson foi usado para analisar a correlação entre a expressão da ECA1 e da ECA2 nos epitélios e nos componentes do tecido conjuntivo das amostras de CCE de boca. Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Imunoexpressão da ECA1 e da ECA2 nos CCE de boca

A média de idade dos pacientes acometidos pelos CCE de boca selecionados para o estudo foi de 60 anos, sendo 19 do sexo masculino e 11 do sexo feminino. A língua foi o local mais prevalente, com 12 casos, seguida do assoalho de boca com 6 e da mucosa jugal, rebordo alveolar e palato mole com 4 casos cada.

A imunorreatividade positiva para a ECA1 foi encontrada em todos os casos de CCE de boca e em 17 casos (56,7%) para a ECA2, em diferentes porcentagens e intensidades de coloração a depender do componente parenquimatoso ou estromal (Tabela 1).

A coloração imunoistoquímica mostrou expressão citoplasmática predominantemente forte para a ECA1 (90%) e fraca para a ECA2 (33,3%) nas células do parênquima tumoral de superfície e dentro dos ninhos tumorais (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D). Quanto aos componentes estromais, houve imunorreatividade citoplasmática positiva em fibroblastos apenas para a ECA1, sendo forte em 86,6% dos casos (Figuras 1E, 1F) (Tabela 1).

O endotélio vascular expressou a ECA1 em todos os casos, com imunorreatividade forte em 93,3%. No entanto, a ECA2 foi positiva em apenas 33,3% dos casos, com imunorreatividade predominantemente fraca (Figuras 1G, 1H). (Tabela 1).

Em 19 casos estudados havia a presença de fibras musculares esqueléticas, sendo integralmente coradas para ECA1, com imunoexpressão forte em 94,7%. Para

a ECA2, 66,7% da amostra apresentou as fibras musculares esqueléticas consistentemente negativas; dos 6 casos positivos, 3 demonstraram fraca imunorreatividade (Figuras 1I, 1J). Nervos periféricos foram evidenciados em 14 amostras. Todas demonstrando positividade para a ECA1, com expressão forte em 85,7%; e ausência de marcação para a ECA2 em 73,3% (Figuras 1K, 1L) (Tabela 1).

Por último, tecidos glandulares foram detectados em 9 amostras. Dessas, 8 apresentaram imunorreatividade positiva para a ECA1, com 55,5% expressando-a fortemente. Em contraste, apenas 1 caso evidenciou imunopositividade para a ECA2, com expressão fraca (Tabela 1).

Quando comparadas as médias dos IC das expressões imunoistoquímicas para a ECA1 e para a ECA2 nas amostras de CCE de boca, foi observada diferença significativa entre as médias dos IC das células do parênquima tumoral imunopositivas para a ECA1 comparada a ECA2, com uma maior média de imunoexpressão para a ECA1 ($t(29)=10,47$; $p<0,001$). A mesma análise foi realizada para comparar as médias dos IC dos componentes estromais. Verificou-se que somente o componente “tecido glandular” não apresentou diferença significativa na imunoexpressão para a ECA1 comparada a ECA2 ($t(8)=2,42$; $p=0,60$) (Tabela 2).

As células do parênquima e os componentes do estroma tumoral expressaram diferentes médias do IC dependendo do grau histológico do tumor. Através de testes estatísticos evidenciou-se a existência de efeito estatisticamente significativo do grau histológico sobre a média dos IC obtidos nas células do parênquima tumoral [$F(2, 27)=8,707$; $p<0,001$], nos fibroblastos [$X^2(2)=11,576$; $p=0,003$], nos vasos sanguíneos [$X^2(2) = 14,337$; $p=0,001$], nos nervos periféricos [$X^2(2) = 7,316$; $p=0,026$] e sobre a média dos IC obtidos nos tecidos glandulares [$F(2, 6)=7,96$; $p=0,02$] que expressaram positivamente a ECA1. O pós-teste mostrou que em média o IC do grupo Bem Diferenciado é menor que IC dos grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado (Tabela 3). Em contraste à ECA1, as mesmas análises demonstraram não existir efeito do grau de diferenciação celular do tumor sobre a média dos IC obtidos para a ECA2.

A localização do tumor demonstrou não fazer efeito sobre a média dos IC obtidos nas células do parênquima e nos componentes do estroma tumoral que expressaram a ECA1 e ECA2 ($p>0,05$).

Notavelmente, a imunexpressão da ECA1 nas células do parênquima tumoral foi positivamente relacionada, de maneira forte, com a imunexpressão da ECA1 nos fibroblastos ($r=0,822$; $p<0,001$), nos vasos sanguíneos ($r=0,831$; $p<0,001$), nos nervos periféricos ($r=0,830$; $p<0,001$) e nos tecidos glandulares ($r=0,731$; $p=0,025$). Sobre as fibras musculares esqueléticas, a correlação foi positiva e moderada ($r=0,697$; $p=0,001$). Essas relações são demonstradas como uma linha reta inclinada para cima na Figura 3(A).

A expressão da ECA2 nas células do parênquima tumoral também foi positivamente relacionada, de maneira forte, com a imunexpressão da ECA2 nos vasos sanguíneos ($r=0,872$; $p<0,001$) e de maneira moderada com os nervos periféricos ($r=0,534$; $p=0,040$) e fibras musculares esqueléticas ($r=0,600$; $p=0,004$). No que se refere aos tecidos glandulares, a correlação foi negativa e fraca ($r=-0,359$; $p=0,383$). Essas relações são demonstradas como uma linha reta inclinada para cima na Figura 3(B).

Imunexpressão da ECA1 e da ECA2 nas mucosas orais saudáveis

A imunorreatividade positiva para a ECA2 foi encontrada, em diferentes porcentagens e intensidades, em todos os casos de mucosa oral saudável e somente em um caso para a ECA1, onde ficou restrita ao epitélio.

A marcação imunoistoquímica mostrou expressão citoplasmática predominantemente fraca para a ECA2 (70%) e negativa para a ECA1 nas células epiteliais localizadas no epitélio de superfície das amostras de mucosa oral saudável (Figura 2A). Nos componentes do tecido conjuntivo, os fibroblastos em todos os casos foram negativos (Figura 2B). Houve marcação positiva para ECA2 no endotélio vascular em 60% da amostra, com imunorreatividade forte em todas elas (Figura 2B). Em 10 amostras estudadas, 5 apresentaram fibras musculares esqueléticas para

análise e todas elas expressaram positivamente a ECA2, com imunoexpressão forte (Figura 2C).

Quando comparadas as médias dos IC das expressões imunoistoquímicas para a ECA2 e para a ECA1 nas amostras de mucosa oral saudável, foi observada diferença significativa entre as médias dos IC das células epiteliais do epitélio de superfície imunopositivas para a ECA2 comparada a ECA1, com uma maior média de imunoexpressão para a ECA2 ($Z=-2,84$; $p=0,004$). A mesma análise foi realizada para comparar as médias dos IC dos vasos sanguíneos, verificando-se diferença significativa na imunoexpressão em ECA2 comparada a ECA1, com uma maior média de imunoexpressão para a ECA2 ($Z=-2,82$; $p=0,005$). Para o componente de fibras musculares esqueléticas, não houve diferença entre as médias dos IC ($Z=-2,82$; $p=0,004$).

O teste estatístico determinou haver efeito do status do tecido (sadio ou neoplásico maligno) sobre a média dos IC obtidos nas células epiteliais que expressaram positivamente a ECA2 [$\chi^2(3) = 23,889$; $p<001$] e sobre a média dos IC obtidos nos vasos sanguíneos que expressaram positivamente a ECA2 [$\chi^2(3) = 19,533$; $p<001$] e a ECA1 [$\chi^2(3) = 11,741$; $p=0,008$].

O pós-teste mostrou que em média, nos casos positivos para a ECA2, o IC do grupo Tecido sadio foi menor que o IC dos grupos Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado, tanto para o componente epitelial quando para os vasos sanguíneos. Já nos casos positivos para a ECA1, o pós-teste mostrou que em média o IC para o componente epitelial do grupo Tecido sadio é menor que o IC para o componente epitelial dos grupos Bem Diferenciado, Moderadamente Diferenciado e Pobremente diferenciado.

DISCUSSÃO

O SRA é um sistema endócrino complexo classicamente associado à regulação da pressão sanguínea e ao equilíbrio de fluidos por meio de seus efeitos nos sistemas renal, cardiovascular e nervoso central (NAKAMURA et al., 2011; RAM et al., 2017). Entretanto, há evidências crescentes do seu papel crítico em muitos estados patológicos, incluindo o desenvolvimento e a progressão do câncer (AGER, NEO & CHRISTOPHI, 2008; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018). Neste estudo foram identificadas as imunoexpressões das proteínas ECA1 e ECA2 em CCE de boca e em amostras de mucosa oral sadia. Verificou-se que os níveis de marcação positivos para a ECA1 foram maiores nos tecidos malignos e de ECA2 nos tecidos saudáveis, que as taxas de expressão da ECA1 se correlacionaram proporcionalmente com o estado de diferenciação do tumor e que a imunomarcação da ECA1 e da ECA2 em células epiteliais malignas foi positivamente correlacionada com a imunomarcação dessas proteínas nos componentes do estroma de tecido conjuntivo subjacente. Até o momento esse foi o primeiro estudo a utilizar esses dois marcadores paralelamente, fazendo as correlações descritas acima.

A superexpressão da ECA1 foi aqui demonstrada, por imunoistoquímica, no citoplasma das células do parênquima tumoral de revestimento e nas ilhas de epitélio que invadiam o tecido conjuntivo subjacente. Essa expressão também foi descrita em estudos anteriores, com a presença da marcação dessa proteína e dos seus produtos em células cancerosas de vários tumores, incluindo mama (OH et al., 2016), sistema gastrointestinal (HUANG et al., 2014), pulmão (XU et al., 2021), pâncreas (LIU et al., 2022), próstata (CHOW et al., 2009), CCEs de pele (GRZEGRZOLKA et al., 2013) e CCE de cabeça e pescoço (NALLAIAH et al., 2018), dentre eles o de boca (RAM et al., 2017). Acredita-se que essa superexpressão ocorra porque em vários órgãos existe um sistema SRA local que pode, por mecanismos parácrinos, ativar ATIIR1 via ATII em células malignas afetando a proliferação celular e a sinalização pró-sobrevivência, suprimindo a apoptose (AGER et al., 2008; CLERE et al., 2010; YANG et al., 2021).

Alterações na expressão dos componentes do SRA parecem correlacionar-se com o grau do tumor (LOUIS et al., 2007; YE et al., 2015). Essas alterações, no

entanto, não são consistentes e variam de acordo com as neoplasias. Por exemplo, no presente estudo as taxas de expressão positivas para a ECA1, mas não para a ECA2, aumentaram proporcionalmente ao grau do tumor, onde os tumores moderadamente diferenciados e os pobremente diferenciados expressaram mais fortemente a proteína quando comparados aos bem diferenciados e as amostras de mucosa oral sadia. Ye e colaboradores (2015) demonstraram, em amostras de carcinomas hepatocelulares, que as concentrações de ATII, Ang (1-7) e VEGF também cresceram de acordo com o grau do tumor. Por outro lado, foi descrito que altos níveis de ATIIIR1 foram encontrados na hiperplasia da mama, mas diminuíram quando o câncer de mama se tornou invasivo (DE PAEPE et al., 2002; ARRIETA et al., 2015). Assim, esse aumento associado a graus mais altos ou mais baixos do tumor pode depender da expressão de outros componentes do SRA (AGER et al., 2008).

A evidência da desregulação do SRA durante a malignidade se estende além das células cancerígenas e é frequentemente observada no estroma circundante e na sua vasculatura (HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; DE CICCIO et al., 2019; SILJEE et al., 2021). Neste estudo a ECA1 foi identificada de forma expressiva no endotélio dos microvasos localizados dentro estroma, entre as ilhas de epitélio neoplásico. Isso é consistente com outros relatos em culturas de células de CCE na região de cabeça e pescoço e em cavidade oral (YASUMATSU et al., 2004; FEATHERSTON et al., 2016; BAILLIE et al., 2016; HINSLEY et al., 2017; RAM et al., 2017; MATSUSHIMA-OTSUKA et al., 2018; NALLAIAH et al., 2019; SILJEE et al., 2021). A localização da ECA1 no endotélio dos microvasos do tumor sugere o seu papel na vasculogênese, processo que gira em torno da ativação da proteína VEGF e que está diretamente relacionado à regulação da transição epitelial-mesenquimal (TEM) (FAN et al., 2013; DE CICCIO et al., 2019; HINSLEY et al., 2019).

A TEM é um processo complexo de desdiferenciação reversível que converte células cancerígenas epiteliais em células desdiferenciadas com características mesenquimais adicionais. Esse processo é caracterizado pela perda de características epiteliais e aquisição de fenótipos mesenquimais invasivos/metastáticos, tendo participação efetiva do SRA e dos seus produtos (FAN et al., 2013; RAM et al., 2017; HSU et al., 2020; SILJEE et al., 2021). Aqui foi demonstrada a correlação positiva entre a imunomarcagem da ECA1 nas células epiteliais malignas com a marcação positiva dessa proteína nos componentes do

estroma de tecido conjuntivo subjacente, dos quais os fibroblastos foram os mais numerosos. Hisley e colaboradores (2019) identificaram, em CCE de cabeça e pescoço, que as expressões aberrantes de ATIR1 e de seu ligante ATII conseguem estimular fatores derivados de fibroblastos orais a desencadear alterações fenotípicas em células epiteliais adjacentes, promovendo a progressão do tumor. E que, por sua vez, fatores do ambiente estromal, incluindo aqueles gerados por células cancerígenas e pelos próprios fibroblastos, são capazes de promover alterações fenotípicas do tipo migratórias e contráteis nesses fibroblastos.

O eixo formado pela ECA2 é um potente contrarregulador em oposição a atividade da ECA1, possivelmente desempenhando um papel protetor contra muitas doenças, especialmente o carcinoma (PINTER & JAIN, 2017; NALLAIAH et al., 2019, AFSAR et al., 2021). Na amostra investigada a ECA2 apresentou imunorreatividade predominantemente fraca nas células do parênquima tumoral e no endotélio de alguns vasos sanguíneos, sendo negativa nos fibroblastos. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhong e colaboradores (2020) ao constatarem, em linhagens celulares de CCE de cabeça e pescoço, níveis baixos de marcação para essa proteína em células neoplásicas e nos vasos e negativa nos fibroblastos. Estudos que analisaram, em mais de 119 tipos de cânceres, a relação entre os níveis de expressão da ECA2 e a agressividade dos tumores descobriram que a superexpressão dessa proteína pode inibir o crescimento celular, a invasão tumoral, a angiogênese, a metástase e a produção de metaloproteinases, interferindo na TEM. Esses achados foram mais frequentes em tumores com atividade endócrina/neuroendócrina (FENG et al., 2011; XU et al., 2012; ZHONG et al., 2020; MEINERS et al., 2021; SILJEE et al., 2021).

Com a descoberta recente da ECA2 como receptor para o do SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, as pesquisas para a identificação dessa proteína na mucosa oral aumentaram. Os resultados indicaram que a ECA2 é expressa no citoplasma das células epiteliais orais de várias localizações, especialmente na mucosa bucal, lábio e língua, não sendo observada nos núcleos e na camada de queratina. Além disso, a imunomarcação positiva também foi encontrada em células endoteliais e negativa em fibroblastos (ZHONG et al., 2020; OKUI et al., 2021; PENG et al., 2021; SAWA et al., 2021; SAPKOTA et al., 2022). Esses achados corroboram

com os resultados encontrados no presente estudo e indicam as células epiteliais orais como potenciais alvos do vírus SARS-CoV-2.

A ECA1, ATII e ATIIIR1 facilitam a patogênese do câncer, já a ECA2, Ang 1-7 e ATIIIR2 inibem a progressão da doença e antagonizam as ações das primeiras (SARODE et al., 2020). Diante disso, muitas linhas de evidência sugerem que os IECA e BRA, ambos os medicamentos comumente usados na terapia anti-hipertensiva, podem ser alternativas no tratamento do câncer através da inibição de reações sistêmicas e atividades do SRA local, afetando a proliferação celular, a angiogênese e a inflamação (SARODE et al., 2020; AFSAR et al., 2021). Os resultados de Wolter e colaboradores (2013) demonstraram que o uso do propranolol reduziu a viabilidade, induziu apoptose e inibiu a produção da proteína pró-angiogênica VEGF em linhagens celulares de CCE de cabeça e pescoço. Matsushima-Otsuka e colaboradores (2018) examinaram os efeitos do losartana, um BRA, em linhagens celulares de CCE moderadamente diferenciados de língua. O losartana suprimiu o transporte nuclear do receptor 1 da angiotensina e reduziu os níveis intracelulares de angiotensina II através da supressão da renina e da catepsina G. Yasumatsu e colaboradores (2004) verificaram que o uso do perindoprilato *in vivo*, um BRA, reduziu significativamente a formação de novos vasos e suprimiu o crescimento do tumor em comparação com o controle devido à supressão da angiogênese induzida por VEGF. Apesar dos efeitos benéficos dos ECAi, antes de usá-los no tratamento do câncer, precisa-se de mais estudos que visem a compreensão de como eles podem regular o crescimento do tumor e, mais importante, qual a melhor forma de manipular o SRA para esse fim (AGER et al., 2008).

CONCLUSÃO

Os níveis de marcação positivos para a ECA1 foram maiores nos tecidos malignos e de ECA2 nos tecidos saudáveis, as taxas de expressão da ECA1 se correlacionaram proporcionalmente com o menor estado de diferenciação do tumor e a imunomarcação da ECA1 e da ECA2 no parênquima foi positivamente correlacionada com a imunomarcação dessas proteínas nos componentes do estroma tumoral. Esses resultados contribuem para a melhor compreensão do papel do SRA na tumorigênese e a expressão das enzimas desse sistema no CCE de boca pode

levantar a possibilidade do uso dessas como prováveis alvos terapêuticos neste tumor.

REFERÊNCIAS

1. Feng H, Wei X, Pang L, Wu Y, Hu B, Ruan Y, Liu Z, Liu J, Wang T. Prognostic and Immunological Value of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Pan-Cancer. *Front Mol Biosci.* 2020 Sep 1;7:189.
2. Featherston T, Yu HH, Dunne JC, Chibnall AM, Brasch HD, Davis PF, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Buccal Mucosal Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg.* 2016 Sep 27;3:52.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
4. Global Cancer Observatory. Cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>).
5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2023.
6. Hinsley EE, de Oliveira CE, Hunt S, Coletta RD, Lambert DW. Angiotensin 1-7 inhibits angiotensin II-stimulated head and neck cancer progression. *Eur J Oral Sci.* 2017 Aug;125(4):247-257. doi: 10.1111/eos.12356. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28653423.
7. Ram RS, Brasch HD, Dunne JC, Davis PF, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Lip Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg.* 2017 Jun 6;4:30. doi: 10.3389/fsurg.2017.00030. PMID: 28634582; PMCID: PMC5459876
8. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104551. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104551. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31986342.
9. Chatterjee A, Laskar SG, Chaukar D. Management of early oral cavity squamous cancers. *Oral Oncol.* 2020 May;104:104627.

10. Dhar H, Vaish R, D'Cruz AK. Management of locally advanced oral cancers. *Oral Oncol.* 2020 Jun;105:104662. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104662. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32278110.
11. Hsu PJ, Yan K, Shi H, Izumchenko E, Agrawal N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104552. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104552. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31918173; PMCID: PMC7659372.
12. Prime SS, Cirillo N, Hassona Y, Lambert DW, Paterson IC, Mellone M, Thomas GJ, James EN, Parkinson EK. Fibroblast activation and senescence in oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2017 Feb;46(2):82-88. doi: 10.1111/jop.12456. Epub 2016 May 30. PMID: 27237745.
13. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer.* 2019 Mar 30;18(1):63. doi: 10.1186/s12943-019-0983-5. PMID: 30927923; PMCID: PMC6441173.
14. Matsushima-Otsuka S, Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Ohmori H, Nakashima C, Kishi S, Nishiguchi Y, Fujii K, Luo Y, Kuniyasu H. Significance of intranuclear angiotensin-II type 2 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018 Nov 27;9(93):36561-36574. doi: 10.18632/oncotarget.26337. PMID: 30564297; PMCID: PMC6290968.
15. Siljee S, Buchanan O, Brasch HD, Bockett N, Patel J, Paterson E, Purdie GL, Davis PF, Itinteang T, Tan ST. Cancer Stem Cells in Metastatic Head and Neck Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Cells.* 2021 Jan 27;10(2):243. doi: 10.3390/cells10020243. PMID: 33513805; PMCID: PMC7910940.
16. Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2011 Oct;119(5):345-51. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00850.x. Epub 2011 Aug 5. PMID: 21896050.
17. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis.* 2008 Sep;29(9):1675-84. doi: 10.1093/carcin/bgn171. Epub 2008 Jul 16. PMID: 18632755.

18. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010 Nov;10(11):745-59.
19. Nallaiah S, Lee VMY, Brasch HD, de Jongh J, Schaijik BV, Marsh R, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells within moderately differentiated head and neck cutaneous squamous cell carcinoma express components of the renin-angiotensin system. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2019 Sep;72(9):1484-1493. doi: 10.1016/j.bjps.2018.11.013. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30528285.
20. Yang J, Yang X, Gao L, Zhang J, Yi C, Huang Y. The role of the renin-angiotensin system inhibitors in malignancy: a review. *Am J Cancer Res*. 2021 Mar 1;11(3):884-897. PMID: 33791161; PMCID: PMC7994166.
21. Liu YT, Lin LW, Chen CY, Wang CP, Liu HP, Houg JY, Chung FM, Shieh TY. Polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene is related to oral cancer and lymph node metastasis in male betel quid chewers. *Oral Oncol*. 2012 Dec;48(12):1257-62. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.06.003. Epub 2012 Jul 7. PMID: 22776130.
22. Pinter M, Jain RK. Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2017 Oct 4;9(410):eaan5616. doi: 10.1126/scitranslmed.aan5616. PMID: 28978752; PMCID: PMC5928511.
23. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, Kanbay M. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021 Apr;23(4):682-696. doi: 10.1007/s12094-020-02488-3. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32930920.
24. Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, Komune S. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004 Oct;130(10):567-73. doi: 10.1007/s00432-004-0582-7. Epub 2004 Jul 27. PMID: 15449186.
25. Baillie R, Itinteang T, Yu HH, Brasch HD, Davis PF, Tan ST. Cancer stem cells in moderately differentiated oral tongue squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2016 Aug;69(8):742-4. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203599. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27095085; PMCID: PMC4975854.
26. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg P. WHO

classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.

27. Allawi N, Abdullah B. Immunohistochemical expression of angiotensin-converting enzyme 2 in superficial and deep maxillofacial tissues: A cross-sectional study. *Health Sci Rep.* 2022 Jul 20;5(4):e737. doi: 10.1002/hsr2.737. PMID: 35873392; PMCID: PMC9297373.
28. Oh E, Kim JY, Cho Y, An H, Lee N, Jo H, Ban C, Seo JH. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt A):1071-81. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.010. Epub 2016 Mar 11. PMID: 26975580.
29. Huang MM, Guo AB, Sun JF, Chen XL, Yin ZY. Angiotensin II promotes the progression of human gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2014 Mar;9(3):1056-60. doi: 10.3892/mmr.2014.1891. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24424956.
30. Xu K, Han H, Luo Y, Ye H, Lin H, Ni L. The Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory State Promotes the Transformation of Non-Small Cell Lung Cancer Blood Supply Pattern Toward Vasculogenic Mimicry Formation. *Front Oncol.* 2021 Jun 16;11:663671. doi: 10.3389/fonc.2021.663671. PMID: 34221978; PMCID: PMC8242235.
31. Liu M, Chen JM, Huang J, Lee LH, Qi CL, Ge L, Wang L. ACE2 and Furin Expressions in Oral Epithelial Cells Possibly Facilitate COVID-19 Infection via Respiratory and Fecal-Oral Routes. *Front Med (Lausanne).* 2020 Dec 10;7:580796. doi: 10.3389/fmed.2020.580796. PMID: 33363183; PMCID: PMC7758442.
32. Chow L, Rezmann L, Catt KJ, Louis WJ, Frauman AG, Nahmias C, Louis SN. Role of the renin-angiotensin system in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Apr 29;302(2):219-29.
33. Grzegorzolka J, Swiatko K, Pula B, Zamirska A, Olbromski M, Bieniek A, Szepietowski J, Rys J, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. ACE and ACE2 expression in normal and malignant skin lesions. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(3):232-8. doi: 10.5603/FHC.2013.0033. PMID: 24203630.
34. Clere N, Corre I, Faure S, Guihot AL, Vessi res E, Chalopin M, Morel A, Coqueret O, Hein L, Delneste Y, Paris F, Henrion D. Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2010 Nov 15;127(10):2279-91. doi: 10.1002/ijc.25234. PMID: 20143398.

35. Louis SN, Wang L, Chow L, Rezmann LA, Imamura K, MacGregor DP, Casely D, Catt KJ, Frauman AG, Louis WJ. Appearance of angiotensin II expression in non-basal epithelial cells is an early feature of malignant change in human prostate. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(5):391-5. doi: 10.1016/j.cdp.2007.08.002. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18031950.
36. Ye G, Qin Y, Lu X, Xu X, Xu S, Wu C, Wang X, Wang S, Pan D. The association of renin-angiotensin system genes with the progression of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 27;459(1):18-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.030. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25701390.
37. De Paepe B, Verstraeten VM, De Potter CR, Bullock GR. Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol.* 2002 Jan;117(1):13-9. doi: 10.1007/s00418-001-0356-0. Epub 2001 Dec 22. PMID: 11819093.
38. Arrieta O, Villarreal-Garza C, Vizcaíno G, Pineda B, Hernández-Pedro N, Guevara-Salazar P, Wegman-Ostrosky T, Villanueva-Rodríguez G, Gamboa-Domínguez A. Association between AT1 and AT2 angiotensin II receptor expression with cell proliferation and angiogenesis in operable breast cancer. *Tumour Biol.* 2015 Jul;36(7):5627-34. doi: 10.1007/s13277-015-3235-3. Epub 2015 Feb 15. PMID: 25682288.
39. de Cicco RL, Watson JC, Bassi DE, Litwin S, Klein-Szanto AJ. Correction: Simultaneous Expression of Furin and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Progression. *Clin Cancer Res.* 2019 Apr 15;25(8):2673.
40. Fan YL, Zheng M, Tang YL, Liang XH. A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). *Oncol Lett.* 2013 Nov;6(5):1174-1180. doi: 10.3892/ol.2013.1555. Epub 2013 Aug 30. PMID: 24179490; PMCID: PMC3813799.
41. Zhong M, Lin B, Pathak JL, Gao H, Young AJ, Wang X, Liu C, Wu K, Liu M, Chen JM, Huang J, Lee LH, Qi CL, Ge L, Wang L. ACE2 and Furin Expressions in Oral Epithelial Cells Possibly Facilitate COVID-19 Infection via Respiratory and Fecal-Oral Routes. *Front Med (Lausanne).* 2020 Dec 10;7:580796.
42. Meiners J, Jansen K, Gorbokon N, Büscheck F, Luebke AM, Kluth M, Hube-Magg C, Höflmayer D, Weidemann S, Fraune C, Möller K, Bernreuther C, Lebok P,

Menz A, Jacobsen F, Clauditz T, Sauter G, Uhlig R, Wilczak W, Izbicki J, Perez D, Minner S, Burandt E, Krech T, Marx A, Simon R, Steurer S. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protein Is Overexpressed in a Wide Range of Human Tumour Types: A Systematic Tissue Microarray Study on >15,000 Tumours. *Biomedicines*. 2021 Dec 3;9(12):1831. doi: 10.3390/biomedicines9121831. PMID: 34944647; PMCID: PMC8698714.

43. Okui T, Matsuda Y, Karino M, Hideshima K, Kanno T. Oral Mucosa Could Be an Infectious Target of SARS-CoV-2. *Healthcare (Basel)*. 2021 Aug 19;9(8):1068. doi: 10.3390/healthcare9081068. PMID: 34442205; PMCID: PMC8393540.

44. Peng J, Sun J, Zhao J, Deng X, Guo F, Chen L. Age and gender differences in ACE2 and TMPRSS2 expressions in oral epithelial cells. *J Transl Med*. 2021 Aug 19;19(1):358.

45. Sapkota D, Sharma S, S land TM, Braz-Silva PH, Teh MT. Expression profile of SARS-CoV-2 cellular entry proteins in normal oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dent Res*. 2022 Feb;8(1):117-122.

46. Sarode SC, Sarode GS, Sengupta N, Kumar Sharma N, Patil S. Biological behavior of oral squamous cell carcinoma in the background of novel corona virus infection. *Oral Oncol*. 2020 Nov;110:104781.

47. Wolter NE, Wolter JK, Enepekides DJ, Irwin MS. Propranolol as a novel adjunctive treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Oct;41(5):334-44.

Tabela 1 – Resultados da expressão imunoistoquímica da ECA1 e ECA 2 nas amostras de Carcinoma de Célula

Variáveis	Parênquima				Estroma									
					Fibroblastos		Vasos sanguíneos		Fibras musculares esqueléticas		Nervos periféricos		Tecido glandular	
	ECA1	ECA2	ECA1	ECA2	ECA1	ECA2	ECA1	ECA2	ECA1	ECA2	ECA1	ECA2		
	n*=30	n*=30	n*=30	n*=30	n*=30	n*=30	n*=19	n*=19	n*=14	n*=14	n*=9	n*=9		
Porcentagem de células positivas														
Ausência de marcação	-	43,3%	-	100%	-	66,7%	-	66,7%	-	73,3%	11,1%	87,5%		
10% a 25%	-	6,7%	3,3%	-	3,3%	10,0%	5,3%	-	7,1%	-	-	-		
25% a 50%	10%	23,3%	13,3%	-	-	10,0%	-	14,3%	-	20,0%	11,1	-		
50% a 75%	43,3%	26,7%	73,3%	-	23,3%	13,3%	57,9%	9,5%	57,1%	6,7%	44,4%	12,5%		
>75%	46,7%	-	10%	-	73,3%	-	36,8%	-	35,7%	-	33,3%			
Intensidade de coloração														
Ausência de marcação	-	43,3%	-	100%	-	66,7%		66,7%	-	73,3%	11,1%	88,9%		
Fraca intensidade	10%	30,0%	10%	-	6,7%	10,0%	5,3%	9,5%	6,7%	13,3%	33,3%	11,1%		
Moderada intensidade	20%	26,7%	20%	-	20	23,3%	26,3%	14,3%	28,6%	13,3%	11,1%	-		
Forte intensidade	70%	-	70%	-	73,3	-	68,4%	-	57,1%	-	44,4%	-		
Índice de coloração														
0	-	43,3%	-	100%	-	66,7%	-	66,7%	-	73,3%	11,1%	87,5%		
1	-	6,7%	3,3%	-	-	10,0%	5,3%	-	7,1%	-	-	-		
2	3,3%	20,0%	3,3%	-	3,3%	-	-	9,5%	-	13,3%	-	-		
3	6,7%	3,3%	3,3%	-	3,3%	-	-	-	-	-	33,3%	12,5%		
4	-	3,3%	3,3%	-	-	10,0%	-	4,8%	7,1%	6,7%	-	-		
6	16,7%	23,3%	23,3%	-	6,7%	13,3%	21,1%	9,5%	14,3%	6,7%	-	-		
8	10%	-	-	-	13,3%	-	5,3%	-	14,3%	-	11,1%	-		
9	26,7%	-	53,3%	-	13,3%	-	36,8%	-	42,9%	-	22,2%	-		
12	36,7%	-	10%	-	60%	-	31,6%	-	14,3%	-	22,2%	-		

*Corresponde ao número de casos que apresentavam o componente para avaliação

Fonte: O autor (2023)

Tabela 2 – Comparação das médias dos IC das expressões imunoistoquímicas da ECA1 e ECA2 nas amostras de Carcinoma de Células Escamosas de boca.

Variáveis	Medidas						Teste t		
	ECA1			ECA2			t	Gl	p
	Média	DP	N	Média	DP	N			
Parênquima	8,86	3,03	30	2,10	2,42	30	10,47	29	<0,001
Fibroblasto	7,73	2,72	30	0,00	0,00	30	15,52	29	<0,001
Vasos sanguíneos	10,03	2,85	30	1,30	2,23	30	15,45	29	<0,001
Músculo esquelético	9,29	2,36	19	1,17	2,12	19	11,93	18	<0,001
Nervo periférico	8,45	2,42	14	0,90	1,86	14	11,11	13	<0,001
Tecido glandular	4,33	3,44	9	0,50	1,22	9	2,42	8	0,060

Fonte: O autor (2023)

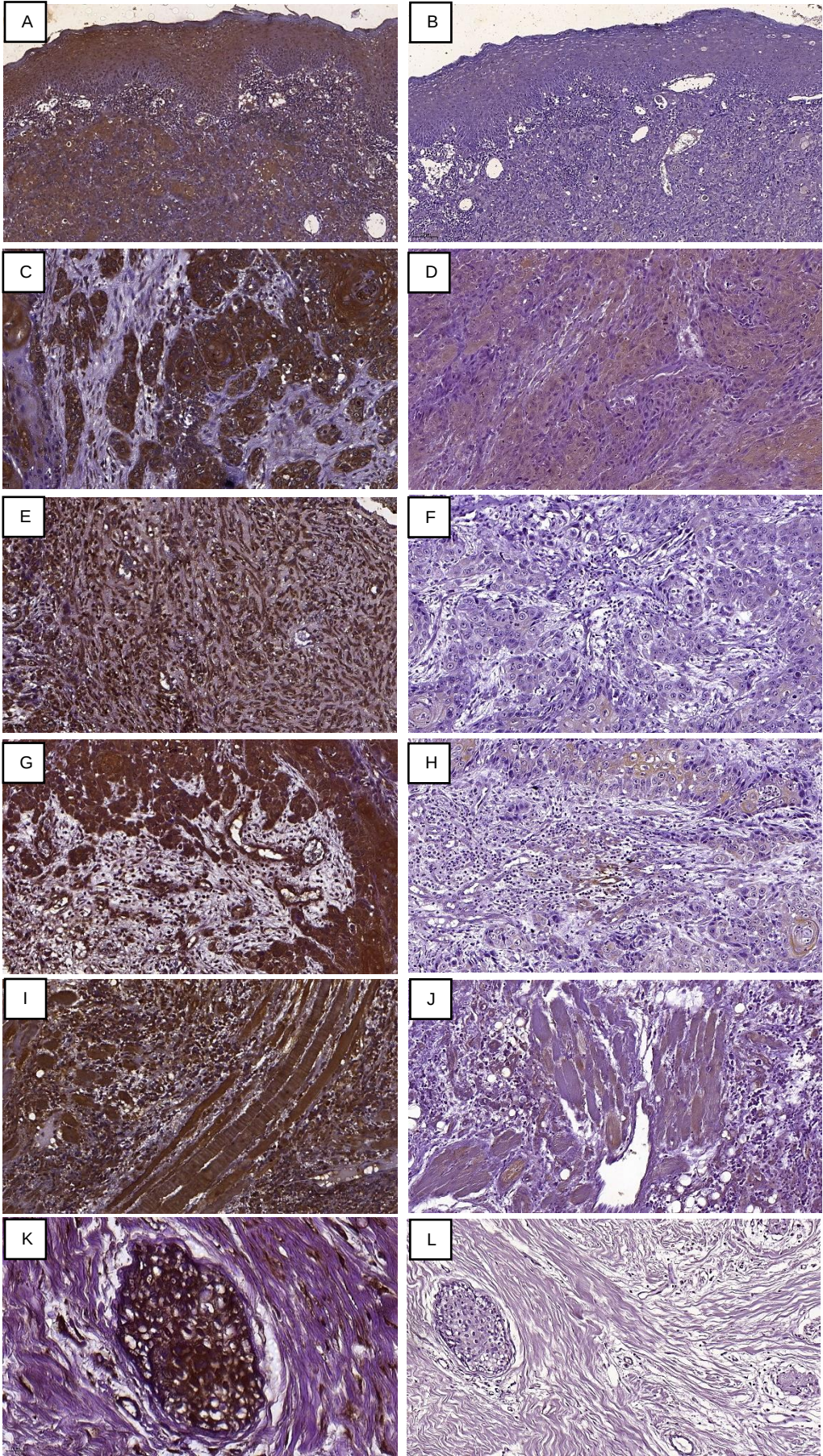
Tabela 3 - Análise da imunoexpressão da ECA1 segundo o grau de diferenciação celular nas amostras de Carcinomas de Células Escamosas de boca

Variáveis	Grau de diferenciação celular			Valor de <i>p</i>
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrememente diferenciado	
Parênquima (n=30)	6,30 ± 3,09	9,6 ± 2,36	10,70 ± 1,70	<0.001*
Fibroblasto (n=30)	5,40 ± 2,67	8,70 ± 1,70	9,10 ± 2,18	0,003**
Vasos sanguíneos (n=30)	7,30 ± 3,26	11,40 ± 1,26	11,40 ± 1,26	0,001**
Músculo esquelético (n=19)	7,12 ± 3,60	9,75 ± 1,50	10,28 ± 1,60	0,075**
Nervo periférico (n=14)	5,66 ± 2,87	9,00 ± 0,00	9,83 ± 1,72	0,026**
Tecido glandular (n=9)	3,40 ± 2,88	10,5 ± 2,12	10,5 ± 2,12	<0.001*

*Anova de uma via ** Kruskal-Wallis

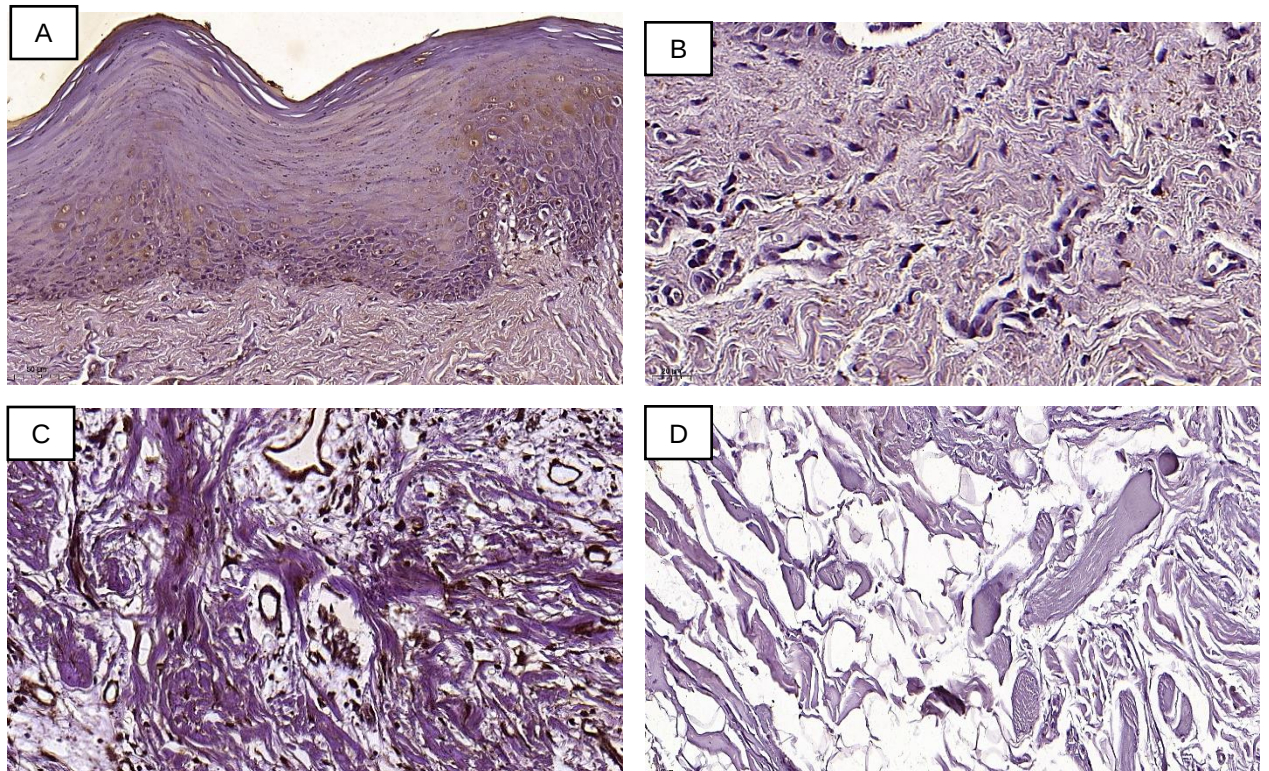
Fonte: O autor (2023)

Figura 1 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-1 e da ECA-2 em amostras de CCE de boca (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais neoplásicas malignas positivas para ECA-1 (100x). (B) Células epiteliais neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (100x). (C) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-1 (200x). (D) Ilhas de células neoplásicas malignas positivas para ECA-2 (200x). (E) Fibroblastos positivos para ECA-1 (200x). (F) Fibroblastos negativos para ECA-2 (200x). (G) Endotélio vascular positivo para ECA-1 (200x). (H) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (I) Fibras musculares positivas para ECA-1 (200x). (J) Fibras musculares positivas para ECA-2 (200x). (K) Nervo periférico positivo para ECA-1 (400x). (L) Nervo periférico negativo para ECA-2 (200x).



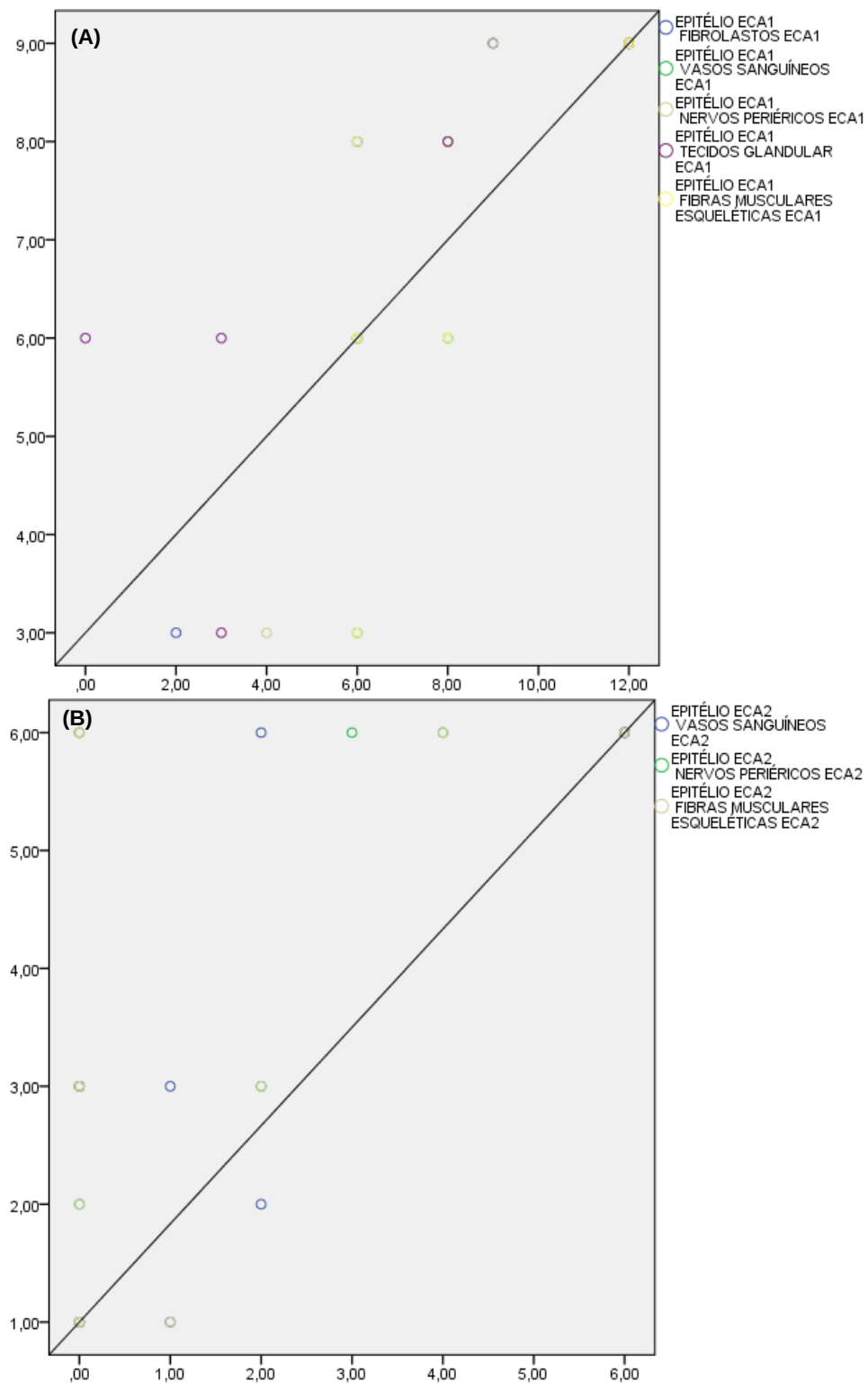
Fonte: O autor (2023)

Figura 2 – Fotomicrografia da expressão imunoistoquímica da ECA-2 em amostras de mucosa oral saudável (método estreptavidina-biotina-peroxidase). (A) Células epiteliais positivas para ECA-2 (100x). (B) Fibroblastos negativos para ECA-2 (400x) (C) Endotélio vascular positivo para ECA-2 (200x). (D) Fibras musculares negativas para ECA-2 (200x).



Fonte: O autor (2023)

Figura 3 – Diagrama de dispersão mostrando a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nas células epiteliais malignas contra a expressão de ECA1 (A) e ECA2 (B) nos componentes do estroma subjacente.



Fonte: O autor (2023)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nas amostras de CCEs de boca houve uma maior expressão positiva para a ECA1;
- As amostras de mucosa oral sadias apresentaram uma imunorreatividade mais expressiva para a ECA2;
- As taxas de expressão da ECA1 se correlacionaram proporcionalmente com o estado de diferenciação do tumor;
- A imunomarcção da ECA1 e da ECA2 em células epiteliais malignas foi positivamente correlacionada com a imunomarcção dessas proteínas nos componentes do estroma de tecido conjuntivo subjacente.
- A localização do tumor não influenciou a expressão da ECA1 e da ECA2 nas células epiteliais malignas e nem nos componentes do tecido conjuntivo.

REFERÊNCIAS

1. Feng H, Wei X, Pang L, Wu Y, Hu B, Ruan Y, Liu Z, Liu J, Wang T. Prognostic and Immunological Value of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Pan-Cancer. *Front Mol Biosci.* 2020 Sep 1;7:189.
2. Featherston T, Yu HH, Dunne JC, Chibnall AM, Brasch HD, Davis PF, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Buccal Mucosal Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg.* 2016 Sep 27;3:52.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
4. Global Cancer Observatory. Cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>).
5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2023.
6. Hinsley EE, de Oliveira CE, Hunt S, Coletta RD, Lambert DW. Angiotensin 1-7 inhibits angiotensin II-stimulated head and neck cancer progression. *Eur J Oral Sci.* 2017 Aug;125(4):247-257.
7. Ram RS, Brasch HD, Dunne JC, Davis PF, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Lip Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg.* 2017 Jun 6;4:30.
8. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104551.
9. Chatterjee A, Laskar SG, Chaukar D. Management of early oral cavity squamous cancers. *Oral Oncol.* 2020 May;104:104627.
10. Dhar H, Vaish R, D'Cruz AK. Management of locally advanced oral cancers. *Oral Oncol.* 2020 Jun;105:104662.
11. Hsu PJ, Yan K, Shi H, Izumchenko E, Agrawal N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104552.

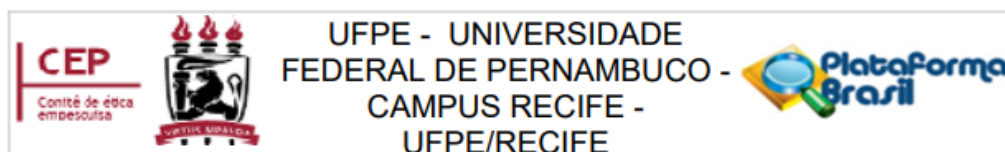
12. Prime SS, Cirillo N, Hassona Y, Lambert DW, Paterson IC, Mellone M, Thomas GJ, James EN, Parkinson EK. Fibroblast activation and senescence in oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2017 Feb;46(2):82-88.
13. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer*. 2019 Mar 30;18(1):63.
14. Matsushima-Otsuka S, Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Ohmori H, Nakashima C, Kishi S, Nishiguchi Y, Fujii K, Luo Y, Kuniyasu H. Significance of intranuclear angiotensin-II type 2 receptor in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018 Nov 27;9(93):36561-36574.
15. Siljee S, Buchanan O, Brasch HD, Bockett N, Patel J, Paterson E, Purdie GL, Davis PF, Itinteang T, Tan ST. Cancer Stem Cells in Metastatic Head and Neck Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Cells*. 2021 Jan 27;10(2):243.
16. Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1 β -induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2011 Oct;119(5):345-51.
17. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1675-84.
18. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010 Nov;10(11):745-59.
19. Nallaiah S, Lee VMY, Brasch HD, de Jongh J, Schaijik BV, Marsh R, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells within moderately differentiated head and neck cutaneous squamous cell carcinoma express components of the renin-angiotensin system. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2019 Sep;72(9):1484-1493.
20. Yang J, Yang X, Gao L, Zhang J, Yi C, Huang Y. The role of the renin-angiotensin system inhibitors in malignancy: a review. *Am J Cancer Res*. 2021 Mar 1;11(3):884-897.
21. Liu YT, Lin LW, Chen CY, Wang CP, Liu HP, Houng JY, Chung FM, Shieh TY. Polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene is related to oral cancer and lymph node metastasis in male betel quid chewers. *Oral Oncol*. 2012 Dec;48(12):1257-62.

22. Pinter M, Jain RK. Targeting the renin-angiotensin system to improve cancer treatment: Implications for immunotherapy. *Sci Transl Med*. 2017 Oct 4;9(410):eaan5616.
23. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, Kanbay M. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021 Apr;23(4):682-696.
24. Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, Komune S. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004 Oct;130(10):567-73..
25. Baillie R, Itinteang T, Yu HH, Brasch HD, Davis PF, Tan ST. Cancer stem cells in moderately differentiated oral tongue squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2016 Aug;69(8):742-4.
26. Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochem Pharmacol*. 2008 Feb 15;75(4):781-6.
27. Du J, Lan J, Yang H, Ying Q, Huang G, Mou J, Long J, Qiao Z, Hu Q. Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (ACE I/D) gene polymorphism with susceptibility to prostate cancer: an updated meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2022 Nov 4;20(1):354..
28. Rhodes DR, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Kalyana-Sundaram S, Lonigro RJ, Helgeson BE, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Hayes DF, Lucas PC, Varambally S, Chinnaiyan AM. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 23;106(25):10284-9.
29. Park YA, Choi CH, Do IG, Song SY, Lee JK, Cho YJ, Choi JJ, Jeon HK, Ryu JY, Lee YY, Kim TJ, Bae DS, Lee JW, Kim BG. Dual targeting of angiotensin receptors (AGTR1 and AGTR2) in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2014 Oct;135(1):108-17.
30. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, Kanbay M. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021 Apr;23(4):682-696.
31. Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten

- years after. *BMC Biol.* 2013 Apr 15;11:36.
32. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 1;13(3):789-94.
 33. Devaux CA, Camoin-Jau L. An update on angiotensin-converting enzyme 2 structure/functions, polymorphism, and duplicitous nature in the pathophysiology of coronavirus disease 2019: Implications for vascular and coagulation disease associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Front Microbiol.* 2022 Nov 28;13:1042200.
 34. Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millán S, Sánchez-Corona J. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Jun;16(2):227-33.
 35. Bratlie SO, Casselbrant A, Edebo A, Fändriks L. Support for involvement of the renin-angiotensin system in dysplastic Barrett's esophagus. *Scand J Gastroenterol.* 2017 Mar;52(3):338-343..
 36. Okwan-Duodu D, Landry J, Shen XZ, Diaz R. Angiotensin-converting enzyme and the tumor microenvironment: mechanisms beyond angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013 Aug 1;305(3):R205-15.
 37. Oosthuizen D, Sturrock ED. Exploring the Impact of ACE Inhibition in Immunity and Disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2022 Aug 4;2022:9028969.
 38. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1503-23.
 39. Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertension: To Use or Not to Use? *J Am Coll Cardiol.* 2018 Apr 3;71(13):1474-1482.
 40. Almutlaq M, Alamro AA, Alamri HS, Alghamdi AA, Barhoumi T. The Effect of Local Renin Angiotensin System in the Common Types of Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Sep 3;12:736361..
 41. Jiang H, Tai Z, Chen Z, Zhu Q, Bao L. Clinical applicability of renin-angiotensin system inhibitors in cancer treatment. *Am J Cancer Res.* 2021 Feb 1;11(2):318-336.
 42. Li XY, Sun JF, Hu SQ. The renin-angiotensin system blockers as adjunctive therapy for cancer: a meta-analysis of survival outcome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Mar;21(6):1375-1383..

43. Yoshida T, Kinoshita H, Fukui K, Matsuzaki T, Yoshida K, Mishima T, Yanishi M, Komai Y, Sugi M, Inoue T, Murota T, Matsuda T. Prognostic Impact of Renin-Angiotensin Inhibitors in Patients with Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy. *Ann Surg Oncol*. 2017 Mar;24(3):823-831. doi: 10.1245/s10434-016-5534-3. Epub 2016 Oct 11.
44. Wei J, Zhou Z, Xu Z, Zeng S, Chen X, Wang X, Liu W, Liu M, Gong Z, Yan Y. Retrospective clinical study of renin-angiotensin system blockers in lung cancer patients with hypertension. *PeerJ*. 2019 Dec 10;7:e8188.
45. Asgharzadeh F, Hashemzahi M, Moradi-Marjaneh R, Hassanian SM, Ferns GA, Khazaei M, Avan A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers as therapeutic options in the treatment of renal cancer: A meta-analysis. *Life Sci*. 2020 Feb 1;242:117181.
46. Deng Y, Xie Y, Wang M, Xu P, Wei B, Li N, Wu Y, Yang S, Zhou L, Hao Q, Lyu L, Zhang D, Dai Z. Effects of Antihypertensive Drugs Use on Risk and Prognosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of 37 Observational Studies. *Front Pharmacol*. 2022 Jan 11;12:670657.
47. Lee SH, Park J, Park RW, Shin SJ, Kim J, Sung JD, Kim DJ, Yang K. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors and Risk of Cancer: A Population-Based Cohort Study Using a Common Data Model. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jan 21;12(2):263..
48. Oh AR, Park J, Lee JH, Min JJ, Gook J, Jang JN, Lee SH, Kim K, Ahn J. The use of renin angiotensin aldosterone system inhibitors may be associated with decreased mortality after cancer surgery. *Sci Rep*. 2022 Apr 27;12(1):6838.
49. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg P. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.
50. Allawi N, Abdullah B. Immunohistochemical expression of angiotensin-converting enzyme 2 in superficial and deep maxillofacial tissues: A cross-sectional study. *Health Sci Rep*. 2022 Jul 20;5(4):e737.
51. Shen J, Huang YM, Wang M, Hong XZ, Song XN, Zou X, Pan YH, Ling W, Zhu MH, Zhang XX, Sui Y, Zhao HL. Renin-angiotensin system blockade for the risk of cancer and death. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2016 Jul 8;17(3):1470320316656679.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS

Pesquisador: DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56085622.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.336.975

Apresentação do Projeto:

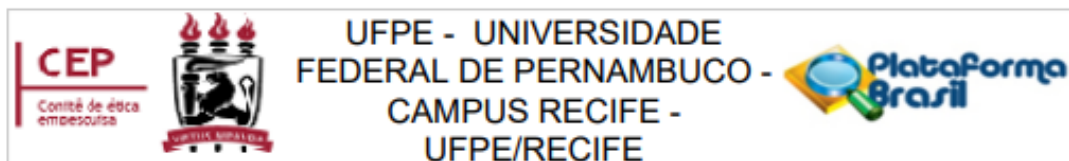
Trata-se de projeto intitulado "EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS", sob a responsabilidade do prof dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ, professor Associado da disciplina de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco. Este projeto foi aprovado pelo Edital de Apoio ao Pesquisador vinculado aos Programas de Pós-Graduação da UFPE, Edital PROPG nº 02/2021.

Metodologia Proposta:

Farão parte da amostra 60 casos clínicos diagnosticados como carcinomas epidermóides orais no laboratório de Patologia Oral da UFPE, no período de 2000 até 2021. Os dados serão coletados a partir das fichas de requisição de exame histopatológico e laudos em modelos padronizados arquivados no Laboratório de Patologia Oral da UFPE, além de amostras de tecido fixados em formalina e emblocados em parafina armazenados no referido laboratório. Os casos diagnosticados como carcinoma epidermóide oral serão selecionados da tabulação do Laboratório de Patologia Oral da UFPE. Para confirmação do diagnóstico e determinação do grau de diferenciação celular do tumor (gradação histológica), os blocos de parafina

de todos os casos serão separados e novos cortes histológicos corados em Hematoxilina Eosina

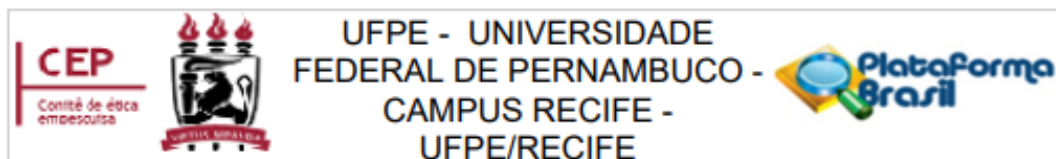
Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.336.975

(HE) serão confeccionados. A revisão será realizada por um patologista oral experiente, o orientador da pesquisa. A análise histopatológica e a gradação serão realizadas de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, com base no grau de diferenciação celular. Os tumores serão classificados da seguinte forma: bem diferenciados, quando apresentarem arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso; moderadamente diferenciados, quando apresentarem algum grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, e pouca queratinização; e pouco diferenciados, quando apresentarem predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima queratinização. Dos casos revisados, as 60 amostras de melhor qualidade serão selecionadas para a análise imunoistoquímica, sendo 20 para cada nível de gradação histológica. Em seguida, serão coletados dados referentes aos pacientes (idade e sexo), às características clínicas das lesões (tamanho, cor, aspecto clínico, localização, tempo de evolução e sintomatologia), bem como as hipóteses de diagnóstico e o tipo de biópsia realizada. Os aspectos clínicos das lesões serão classificados em quatro grupos: ulcerada, leucoplasia, leucoeritroplasia e lesões que apresentavam componente ulcerado com áreas de leucoeritroplasia. Para as reações e análises imunoistoquímicas, serão realizados ensaios imunoistoquímicos para detecção de ATI, da ECA, da ATII, do ATIIR1 e do ATIIR2 (Santa Cruz Biotechnology), utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase. As reações imunoistoquímicas serão realizadas em cortes histológicos de 3µm de espessura dispostos em lâminas silanizadas (Starfrost®, Knitelglass, Gliher, Alemanha). A recuperação antigênica será realizada em uma panela de pressão com tampão citrato (pH 6,0) e a atividade da peroxidase endógena bloqueada com 5 banhos de peróxido de hidrogênio a 20% de 5 minutos cada. A diluição utilizada e o tempo de incubação de cada anticorpo primário serão determinados após padronização das reações. Após incubação com os anticorpos primários, os cortes serão incubados com o anticorpo secundário conjugado com estreptavidina/peroxidase (ImmunoCruz, Santa Cruz Technology) por 30 minutos à temperatura ambiente. Todas as etapas descritas serão seguidas de lavagem com a solução tampão fosfato. Os cortes serão incubados com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB, Dako, Glostrup, Dinamarca) por 30 min e contracolorados com hematoxilina de Mayer. Controles positivos e negativos serão incluídos em todas as reações. As reações serão classificadas em negativa, fraca, moderada ou forte em lâminas que também serão digitalizadas pelo equipamento Pannoramic MIDI. Controles positivos e negativos (omissão do anticorpo primário) serão incluídos em todas as reações.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.336.975

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desse estudo é avaliar a expressão da angiotensina I (ATI), da enzima conversora da angiotensina (ECA), da angiotensina II (ATII), do receptor 1 da angiotensina II (ATIIR1) e do receptor 2 da angiotensina II (ATIIR2), todos componentes do Sistema renina-angiotensina (SRA), em carcinomas epidermóides orais.

Objetivo Secundário:

- Avaliar se os graus histológicos dos tumores influenciam na expressão da ATI, da ECA, da ATII, do ATIIR1 e do ATIIR2;
- Verificar se a localização do tumor influencia na expressão da ATI, da ECA, da ATII, do ATIIR1 e do ATIIR2;
- Investigar se a idade dos pacientes interfere na expressão da ATI, da ECA, da ATII, do ATIIR1 e do ATIIR2;
- Analisar se a apresentação clínica do interfere na expressão da ATI, da ECA, da ATII, do ATIIR1 e do ATIIR2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

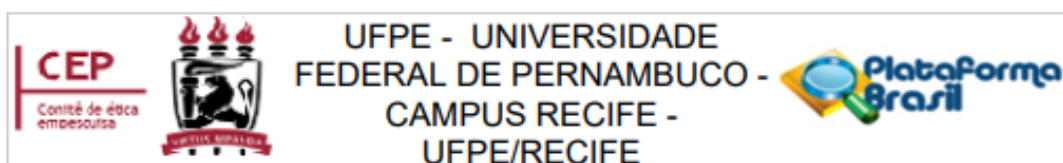
Riscos:

Há a possibilidade de quebra de sigilo ou perda/extravio das fichas clínicas e de encaminhamento de biópsia. No entanto, esse risco será minimizado pois serão analisados dados secundários contidas das fichas clínicas e de encaminhamento de biópsias, não sendo necessária a identificação dos pacientes. Ainda assim, os pesquisadores se comprometem a preservar a identidade dos pacientes através da confidencialidade dos dados. O termo de confidencialidade está devidamente assinado (ANEXO A). Além disso, a fim de diminuir a possibilidade de perda ou extravio das fichas, serão realizadas cópias digitais e estas serão armazenadas em nuvem.

Benefícios:

Os resultados encontrados neste estudo poderão contribuir para a melhor compreensão do papel do SRA no carcinoma epidermóide oral e a expressão das enzimas desse sistema pode levantar a possibilidade do uso dessas como prováveis alvos terapêuticos neste tumor.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.336.975

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto executará ensaios imunoistoquímicos em materiais do banco de dados de tumores do Laboratório de Patologia Oral da UFPE, utilizando dados secundários de prontuários e também material biológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados o CV Lattes do Pesquisador, a solicitação de dispensa de Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), tendo o pesquisador justificado por se tratar de um banco de dados secundário; Carta de Anuência com autorização para uso de dados emitido pelo Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, assinado pela Profa. Dra. Elaine Judite de Amorim Carvalho; folha de rosto assinada por Jair Carneiro Leão, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE.

Recomendações:

Providenciar assinatura legível e carimbo do responsável pela Instituição Proponente na Folha de Rosto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo Aprovado.

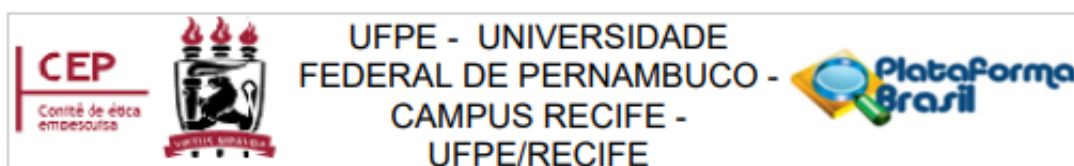
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO, com autorização para iniciar a coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram.

Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em www.ufpe.br/cep para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada com a devida justificativa.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.336.975

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1901869.pdf	21/02/2022 11:55:51		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/02/2022 11:55:19	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
Outros	Resultado_Edital_02_21_13_10_21.pdf	21/02/2022 10:56:42	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
Outros	LATTES.pdf	21/02/2022 10:56:01	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SOLICITACAO DE DISPENSA DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.pdf	21/02/2022 10:55:29	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
Outros	CARTAO DE ANUENCIAMENTO DE DECLARACAO DE AUTORIZACAO DO USO DE DADO S.pdf	21/02/2022 10:55:02	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
Outros	TERMO DE COMPROMISSO DE CONFIDENCIALIDADE.pdf	21/02/2022 10:53:43	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.doc	21/02/2022 10:53:22	DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 07 de Abril de 2022

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br