

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no
desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas
bucal experimental e humano.**

João Paulo Silva Servato

Uberlândia-MG
Agosto/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no
desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas
bucal experimental e humano.**

*Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.*

João Paulo Silva Servato (discente)
Adriano Mota Loyola (orientador)
Paulo Rogério de Faria (co-orientador)
Marcelo José Barbosa Silva (co-orientador)

Uberlândia-MG
Agosto/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S491e
2016 Servato, João Paulo Silva, 1987-
 Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no
 desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal
 experimental e humano / João Paulo Silva Servato. - 2016.
 120 f. : il.

 Orientador: Adriano Mota Loyola.
 Coorientador: Paulo Rogério de Faria.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Imunologia - Teses. 2. Câncer - Teses. 3. Leucoplasia bucal -
Teses. 4. Carcinogênese - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Faria,
Paulo Rogério de. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

João Paulo Silva Servato

"Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal experimental e humano"

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 26 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Marco Túlio Brazão Silva
UNIMONTES

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues
UNIUBE

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
FO/UFU

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
INGEB/UFU

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola - orientador
FO/UFU

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho aos meus Pais pelo incentivo e apoio, sem os quais essa Jornada seria verdadeiramente impossível...”

PENSAMENTOS

“He wants to write words down on pieces of paper, recording them now and recalling them later. It remains a mystery the pages of history outlasted the passing of things that were dear to me.”

"For No Reason" lyrics from Country Joe McDonald (Country Joe and the Fish, 1969).

“Tired of lying in the sunshine staying home to watch the rain. You are young and life is long and there is time to kill today. And then one day you find ten years have got behind you. No one told you when to run, you missed the starting gun.”

“Time” lyrics from Pink Floyd (Roger Waters, David Gilmour, Nick Mason and Richard Wright, 1973).

“One who is equal to friends and enemies, who is equipoised in honor and dishonor, heat and cold, happiness and distress, fame and infamy, who is always free from contamination, always silent and satisfied with anything, who doesn't care for any residence, who is fixed in knowledge and engaged in devotional service, is very dear to Me”. Bhagavad gita As It Is [chapter 12, text 19].

“Quando jovens, julgamos poder talhar no pano do tempo toda sorte de roupas esplêndidas e fantásticas, toda sorte de indumentárias – barretinas e casulas e becas de doutores em filosofia; calças colantes à Nijinsky e calças azuis-ardósias à Rimbaud e camisas vermelhas à Garibaldi. Mas quando já temos uns dez mil dias de vida, então começamos a compreender que seremos felizes se conseguirmos talhar no pano do tempo à nossa disposição, um simples terno decente para usarmos no trabalho diário. É uma compreensão que deprime; e, de todos, o dia do solstício de verão é o que melhor faz compreender isso. É o dia mais longo. Um dos sessenta ou setenta dias mais longos dentre os vinte e cinco mil dias de uma pessoa. E que fiz eu desse dia mais comprido – o mais comprido dentre os tão poucos, tão uniformes, tão ordinários dias? O catálogo de minhas ocupações seria humilhante, de tão absurdo e sem interesse.”

“Sem olhos em Gaza” – Aldous Huxley (página: 339).

AGRADECIMENTO(S)

Ao arquiteto de todos os Universos, Sri- Vasudeva Govinda Krishna Shauri of the Vrishnis, por ter me agraciado com incontáveis “Longos dias e Belas noites”.

A Universidade Federal de Uberlândia, que através do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e da Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA) possibilitaram a conclusão desse Doutorado e a realização de inúmeros trabalhos científicos. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB-UFU), que juntos proporcionaram através do apoio financeiro as condições materiais necessárias para um percurso digno nessa jornada.

Ao Professor Adriano Mota Loyola, por todos os ensinamentos e oportunidades prontamente oferecidas, pelo exemplo de homem honesto, digno, dedicado, trabalhador e por toda amizade que cultivamos.

Aos Professores Paulo Rogério de Faria e Marcelo José Barbosa da Silva, por toda a ajuda oferecida, sem a qual este trabalho nunca seria concretizado.

A todos os Professores e Coordenadores deste e de vários outros Programas de Pós-graduação, pelos ensinamentos e por toda ajuda e exemplo demonstrados.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Bucal: Sérgio Vitorino Cardoso, Adalci dos Anjos Ferreira, Ângela Maria Pereira, Lúbia, Cássio, Vinícius, Marília, Roberta e Luiz sem vocês essa etapa seria extremamente mais difícil. Meu muito obrigado pela amizade, paciência e por todos os momentos compartilhados.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Imunologia, Genética e Histologia que contribuíram com a estrutura necessária para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Ana Paula Carneiro dos Santos, por todo carinho, atenção, auxílio, e dedicação fornecidos sempre de maneira tão sincera e espontânea...

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo nesse e todos os momentos da minha vida.

À todos os habitantes, residentes, inquilinos, visitantes e amigos da *Marley's Clinics* por todos os momentos iluminados e auspiciosos que passamos juntos...

LISTAS DE ABREVIACÕES

4HAQO: 4hidroxiaminoquinolona-N-óxido;

4NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido;

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*;

B2M: beta-2-microglobulina;

CCEB: Carcinoma de Células Escamosas Bucal;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

Ct: *Ciclos de limiar do inglês Threshold cycles*;

CID: Código internacional das doenças;

CTR: Controle de mucosa normal;

DBR: Displasias epiteliais com baixo risco de malignização;

DAR: Displasias epiteliais com alto risco de malignização;

eNOS: *Óxido nítrico sintase endotelial do inglês endothelial nitric oxide synthase*;

ERK: *Quinases reguladas por sinais extracelulares do inglês extracellular signal-regulated kinases*;

F: *adiante do inglês Forward*;

FACS: *Classificação de células ativadas por fluorescência do inglês Fluorescence-Activated Cell Sorting*;

FOUFU: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia;

FSC: *Dispersão Frontal do inglês Forward Scatter*;

FITC: isotiocianato de fluoresceína;

HPV: vírus do papiloma humano do inglês, Human Papiloma Virus;

I: intensidade de marcação;

IKK: vias de sinalização I κ B kinase;

IMF: intensidade média de fluorescência;

iNOS: *Óxido nítrico sintase endotelial do inglês inducible nitric oxide synthase*;

LB: Leucoplasia Bucal;

MQ: mediana de *Quickscore*;

NF-kappaB: fator nuclear kappa B;

NO: óxido nítrico;

NOS: *Óxido nítrico sintase endotelial do inglês nitric oxide synthase*;

nNOS: *Óxido nítrico neuronal endotelial do inglês neuronal nitric oxide synthase*;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

P: proporção de células marcadas;

PBS: tampão fosfato do inglês, phosphate buffer solution;

PM: primários metastáticos;

PNM primários não-metastáticos;

Q: *Quickscore*;

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real, do inglês, Quantitative polymerase chain reaction;

R: reverso do inglês *reverse*;

r: expressão relativa;

SBF: soro bovino fetal;

SSC: *Dispersão Lateral do inglês Side Scatter*;

TMA: Microsséries de tecido do inglês *Tissue Micro Array*;

TNM: T: tamanho do tumor; N: presença e extensão de metástase linfonodal; M: presença ou ausência de metástase à distância;

UFU: Universidade Federal de Uberlândia;

UICC: International Union for Cancer Control;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo hídrico sem e com carcinógeno diluído dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados e não tratados (nt), nas 16 semanas iniciais do acompanhamento, apresentados com mediana e intervalo. Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$) (página: 43).

Figura 2: Avaliação ponderal dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados e não tratados (nt), no momento do sacrifício, apresentada com mediana e intervalo. (A) 16 semanas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (B) 24 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (C) 32 semanas. Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$) (página: 44).

Figura 3: Análise ponderal dos fígados dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados e não tratados (nt), no momento do sacrifício, apresentados com mediana e intervalo. (A) 16 semanas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (B) 24 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (C) 32 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$). Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (página: 44).

Figura 4: Curvas de sobrevida global (Kaplan-Meier) para os grupos de camundongos tratados com 4NQO (*iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}), segregados de acordo com os períodos experimentais. (A) 24 semanas de acompanhamento (Teste Log-Rank, $p = 0,119$); (B) 32 semanas de acompanhamento (Teste Log-Rank, $p < 0,001$) (página: 45).

Figura 5: Análise macroscópica das línguas dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO, em função dos tempos experimentais. (A) Número de lesões (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p = 0,0090$); (B) Severidade das lesões. Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$) (página: 47).

Figura 6: Padrões das características histológicas diagnosticados nos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}; (A) e (B) epitélio normal (H&E, 200x), (C) e (D) epitélio hiperplásico (H&E, 200x), (E) e (F) displasia epitelial com baixo risco de malignização (DBR) (H&E, 200x), (G) e (H) displasia epitelial com alto risco de malignização (DBR) (H&E, 100x), (I) e (J) carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) (H&E, 200x) (página: 50).

Figura 7: Número médio de DBR, DAR e CCEB em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados com 4NQO em todas as datas analisadas. (A) Comparação entre a

incidência média de DBR em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados com 4NQO em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p=0,046$; Tempo: $p=0,9674$; Presença/ Ausência de iNOS (P/A iNOS: $p = 0,0883$); (B) Comparação entre a incidência média de DAR em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p = 0,2719$; Tempo: $p < 0,0001$; P/A iNOS: $p = 0,0013$); (C) Comparação entre a incidência média de CCEB em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p = 0,6004$; Tempo: $p < 0,0001$; P/A iNOS: $p = 0,0151$) (página: 52).

Figura 8: Profundidade de invasão e volume tumoral nos CCEB, representados pela mediana e intervalo de distribuição dos valores. (A) Profundidade de invasão (teste *U* de Mann Whitney; $p < 0,0001$); (B) Volume tumoral (teste *U* de Mann Whitney; $p < 0,0001$) (página: 53).

Figura 9: Distribuição da fluorescência específica para os antígenos estudados, segundo o grupo de animais tratados e não tratados (nt). (A) nt-*iNOS*^{-/-}; (B) nt-*iNOS*^{+/+}; (C) *iNOS*^{-/-}; (D) *iNOS*^{+/+} (Teste Exato de Fisher, $p=0,497$; e Teste Z, $p=0,324$) (página: 54).

Figura 10: Expressão gênica relativa de *NOS2* pela *qPCR* em amostras de tecido humano provenientes de amostras controle, leucoplasia bucal e carcinomas. Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Grupo de mucosa normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinomas (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0058$); (B) LB com alto risco de malignização (LAR) e LB com baixo risco de malignização (LBR) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,8287$); . (C) CCEB metastático (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,2857$) (página: 55).

Figura 11: Padrões das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina em amostras de tecido humano provenientes de de: (A) e (B) mucosa normal (CTR), (C) e (D) displasia epitelial com baixo risco de malignização (DBR), (E) e (F) displasia epitelial com alto risco de malignização (DBR), (G) e (H) carcinoma de células escamosas bucal não metastático (CCEB(NM)) e (I) e (J) carcinoma de células escamosas bucal metastático (CCEB(M)) (página: 57).

Figura 12: Imuno-marcação de iNOS em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasias bucais de alto risco e baixo risco de transformação maligna e carcinoma de células escamosas bucal (CCEB). Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Tecido normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0280$); (B) LB com alto de malignização (LAR) e LB com baixo risco

de malignização (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,1064$); (C) CCEB metastático (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste U de Mann Whitney; $p=0,0078$) (página: 58).

Figura 13: Imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasia bucal e carcinomas. Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Mucosa normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinomas (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0613$); (B) LB de alto risco de malignização (LAR) e LB com baixo risco de malignização (LBR) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,1360$); (C) Carcinomas metastáticos (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste U de Mann Whitney; $p=0,0015$) (página: 59).

Figura 14: Análise de correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina (Teste de teste Spearman, r = coeficiente de variação). (A) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para mucosa normal (teste Spearman, $r=0,1827$; $p=0,5248$); (B) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para as leucoplasias bucais (LB) (teste Spearman, $r=0,4497$; $p=0,0028$); (C) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para o grupo de carcinomas (CCEB) (teste Spearman, $r=0,2502$; $p=0,0209$) (página: 60).

Figura 15: Curvas de sobrevida global (Kaplan–Meier) para os pacientes diagnosticados com CCEB, estratificadas de acordo com as medianas de imuno-marcação para iNOS e nitrotirosina. (A) Análise univariada da sobrevida global considerando alta ($Quickscore \leq 6$) e baixa ($Quickscore > 6$) expressão de iNOS (Teste Log-Rank, $p=0,947$); (B) Análise univariada da sobrevida global considerando a alta P ($Quickscore \leq 5$) e baixa ($Quickscore > 5$) expressão de nitrotirosina (Teste Log-Rank, $p=0,013$) (página: 61).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios morfocitológicos para gradação de displasia epitelial (OMS) (página: 28).

Quadro 2: Sequência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) com suas respectivas referências (página: 32).

Quadro 3: Anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos, com os respectivos clones, origem, código do anticorpo, fabricante, diluições de uso e os respectivos controles positivos empregados (página: 37).

Quadro 4: Distribuição dos *scores* conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas (página: 39).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das lesões linguais nos camundongos tratados por 4NQO, identificadas por análise macroscópica, em função do número e severidade, expressos por mediana e variação, entre parênteses (página: 46).

Tabela 2: Lesões mais graves desenvolvidas e diagnosticadas em cada um dos terços linguais de todos os camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO (página: 51).

Tabela 3: Mediana e intervalo do número total de lesões desenvolvidas e diagnosticadas em todas as línguas dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO (página: 51).

Tabela 4: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de iNOS em amostras de leucoplasia bucal (página: 63).

Tabela 5: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de leucoplasia bucal (página: 63).

Tabela 6: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de iNOS em amostras de carcinoma de células escamosas bucal (página: 64).

Tabela 7: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de carcinoma de células escamosas bucal (página: 64).

Tabela 8: Mediana e intervalo das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina segregadas de acordo com os sub-grupos das variáveis estudadas em amostras de leucoplasia bucal (página: 65).

Tabela 9: Mediana e intervalo das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina segregadas de acordo com os sub-grupos das variáveis estudadas em amostras de carcinomas de células escamosas (página: 66).

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	1
1.1. Carcinoma de células escamosas bucal humano	2
1.2. Carcinoma de células escamosas bucal experimental	9
1.3. NO e a enzima óxido nítrico sintase induzível	14
1.4. iNOS X carcinoma de células escamosas bucal	17
2.0. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Consideração éticas	26
3.2. Carcinogênese bucal experimental	26
3.3. Avaliação do potencial metastático por citometria de fluxo	28
3.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)	30
3.5. Imuno-histoquímica	34
3.6. Análise estatística	39
4.0. RESULTADOS	42
4.1. Descrição de fatores relacionados à carcinogênese bucal experimental em camundongos desafiados com 4NQO	43
4.2. Análise macroscópica das lesões em superfície lingual dos camundongos iNOS ^{+/+} e iNOS ^{-/-} , tratados com 4NQO	45
4.3. Análise microscópica das línguas dos camundongos iNOS ^{+/+} e iNOS ^{-/-} tratados pelo 4NQO	47
4.4. Avaliação da presença de células tumorais circulantes no sangue periférico por meio de citometria de fluxo	54
4.5. Análise da expressão gênica relativa de NOS2 pela técnica da qPCR em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasias bucais e carcinoma de células escamosas bucal	55
4.6. Avaliação da imuno-marcação pela técnica de imuno-histoquímica da proteína iNOS e da modificação pós-traducional de nitrotirosina, em amostras de tecido humano de mucosa normal, leucoplasias e carcinoma de células escamosas bucal	56
4.7. Correlação entre imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina nos grupos estudados	60
4.8. Análise de sobrevida global para os pacientes com carcinoma de células escamosas e sua relação com imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina	60
4.9. Associação da expressão da proteína iNOS e nitrotirosina, com fatores clinicopatológicos relativos aos casos de leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas bucal	61
5.0. DISCUSSÃO	67
6.0. CONCLUSÃO	79
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, SEGUNDO NORMAS VIGENTES DA ABNT	82
ANEXOS	102

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

A proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é a mais importante proteína da família das óxido nítrico sintases, a qual é capaz de produzir grandes quantidades de óxido nítrico. A indução permanente de iNOS foi levantada como potencialmente mutagênica, apresentando um papel central na biologia tumoral. O objetivo deste estudo é investigar o papel da iNOS no desenvolvimento de carcinomas de células escamosas bucais (CCEB), usando um modelo experimental de carcinogênese lingual em camundongos knockouts para *NOS2* e amostras humanas derivadas da mucosa normal, leucoplasia bucal e CCEB.

Camundongos selvagens (*iNOS*^{+/+}) e knockout (*iNOS*^{-/-}) para iNOS foram desafiados com 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) diluída em água potável por 16 semanas e sacrificados após 0, 8 e 16 semanas de acompanhamento. As línguas foram removidas e o número de displasias e carcinomas foram contados. Sangue periférico destes camundongos foram analisados, por citometria de fluxo, em busca de células tumorais circulantes. Amostras humanas derivadas da mucosa normal, leucoplasia e CCEB, foram utilizadas para quantificar o RNA mensageiro (mRNA) de *NOS2*. As amostras humanas também foram imuno-coradas com anticorpos anti-iNOS e anti-nitrotirosina.

Em ambos os grupos, foram observadas uma redução no número de displasias e um aumento de carcinomas da 16 semana até a 32 semanas. Camundongos *iNOS*^{-/-} demonstraram menor número de lesões displásicas e neoplásicas em todos os períodos de avaliação, sendo menores e menos invasivas, quando comparados aos animais selvagens. Aparentemente, há uma tendência em ascensão nos níveis do mRNA e da proteína iNOS durante a carcinogênese bucal humana. Dados similares foram obtidos com a imuno-deteção de nitrotirosina. Além disso, as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina foram associadas a várias características clínicopatológicas dos CCEB (tamanho, presença de metástase, estadiamento e recidiva).

Nossos resultados demonstraram que iNOS afeta o processo de carcinogênese bucal experimental e humana, estando associada com a gênese e progressão dos CCEB. Mais estudos devem ser feitos, para nos fornecer, uma compreensão profunda das funções de iNOS no desenvolvimento de câncer bucal.

PALAVRAS-CHAVES: câncer; óxido nítrico sintase induzível; carcinoma de células escamosas bucal; leucoplasia; displasia bucal; carcinogênese química.

RESUMO EM INGLÊS (ABSTRACT)

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is most important protein of nitric oxide synthases family, which is capable to produce huge amounts of nitric oxide. Permanent induction of iNOS has been raised as potentially mutagenic; presenting pivotal roles in tumor biology. The aim of this study is to investigate the role of iNOS in the development of oral squamous cells carcinomas (OSCC), using a mouse model of oral carcinogenesis in *NOS2* knockout animals and human samples derived from normal mucosa, leukoplakia and OSCC.

Wild-type (*iNOS*^{+/+}) and *NOS2*-knockout (*iNOS*^{-/-}) mice, were challenged with 4-nitroquinoline- 1-oxide (4NQO) in drinking water for 16 weeks and killed after 0, 8 and 16 weeks of after treatment. Tongues were removed and the number of dysplasias and carcinomas was counted. Mice's peripheral blood were analyzed by flux cytometry in search of circulating tumor cells. Human samples derived from normal mucosa, leukoplakia and OSCC, were utilized to relative quantify the amount of *NOS2*-mRNA. The human samples were also immune-stained with anti-iNOS and anti- Nitrotyrosine antibodies.

In both groups, a reduction of dysplasias and an increase of carcinomas from week 16 to week 32 were observed. *iNOS*^{-/-} mice had shown a small number of dysplastic and neoplastic lesion in all evaluated periods, moreover these lesions were usually smaller and less invasive when compared to wild type animals. Apparently, there is a rising tendency in the iNOS mRNA and protein levels during human oral carcinogenesis. Similar findings were obtained in the nitrotyrosine staining. Furthermore, iNOS and nitrotyrosine imuno-stained is associated with several clinic-pathological features of OSCC (site, presence of metastasis, staging and recidive).

Our results shows that, iNOS affects the process of experimental and human oral carcinogenesis, being associated with OSCC genesis and progression. More studies should be done to provide us a deep understanding of the iNOS functions in oral cancer development.

KEYWORDS: cancer; inducible nitric oxide synthase; oral squamous cell carcinoma; oral leukoplakia; oral dysplasia; chemical carcinogenesis.

INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.0. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.1. Carcinoma de células escamosas bucal humano

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma neoplasia invasiva epitelial com diferentes graus de diferenciação escamosa e uma propensão precoce e extensiva para metástases linfonodais, ocorrendo predominantemente em adultos nas 5ª e 6ª décadas de vida (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005). Por ser o tipo mais comum de câncer de cavidade bucal, o CCEB representa 90% das neoplasias malignas que acometem essa região e é a oitava neoplasia maligna mais comum no *ranking* mundial de incidência destas doenças (SIEGEL, *et al.*, 2016). Apresenta variações epidemiológicas importantes entre diferentes regiões geográficas (SCHWARTZ *et al.*, 2000; SIEGEL, *et al.*, 2016). Em algumas regiões, especialmente no subcontinente indiano, o CCEB está entre as neoplasias mais frequentes, em grande parte, devido ao ato de mascar tabaco. Representa em escala global, 5% de todas as neoplasias malignas masculinas e 2% de todas as neoplasias malignas femininas (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005; SIEGEL, *et al.*, 2016).

No Brasil, o CCEB é o sétimo câncer mais comum, com 15.490 novos casos previstos para este ano (INCA, 2016). Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Homens são mais afetados que mulheres por causa da maior exposição aos fatores de risco (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005; INCA, 2016). O etilismo, o tabagismo, as infecções pelo HPV, principalmente pelos tipos 16 e 18 e a exposição à radiação ultravioleta solar, são os fatores de risco discutidos para esse grupo de tumores. Um risco aumentado de desenvolver câncer de cavidade bucal é esperado em pacientes tabagistas e etilistas. Quando esses dois fatores estão juntos, é observada a existência de um sinergismo entre eles. A infecção pelo HPV está associada ao desenvolvimento, principalmente, dos cânceres de orofaringe, amígdala e base da língua, ainda com discutível papel na carcinogênese bucal. A exposição à radiação ultravioleta solar é um importante fator de risco apenas para o câncer de lábio. Embora controverso, a má higiene bucal também foi sugerida com fator de risco (TALAMINI *et al.*, 2000; BALARAM *et al.*, 2002; CHAITANYA *et al.*, 2016). Em um trabalho recente realizado pelo International Head

and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) *consortium*, uma boa higiene bucal, caracterizada por perda de poucos elementos dentários, visitas anuais dentista, e escovação diária, pode reduzir apenas modestamente o risco de CCEB (HASHIM *et al.*, 2016).

Os fatores de risco em jovens enfatizam a importância do consumo pesado e precoce de tabaco e álcool, bem como a exposição ao vírus HPV e o efeito protetor de dietas ricas em frutas e vegetais frescos (LLEWELLYN, *et al.*, 2003). O efeito protetor de dietas ricas em vitaminas antioxidantes é bem demonstrado em muitos países, especialmente em estudos italianos (TAVANI *et al.*, 2001; MARCHIONI, *et al.*, 2002).

Parte da história natural do CCEB está vinculada a presença de lesões cancerizáveis, em especial as leucoplasias (LAPTHANASUPKUL *et al.*, 2007). Em geral, o CCEB se desenvolve a partir da progressão de uma hiperplasia epitelial, passando por diferentes graus de displasia até um carcinoma *in situ* e depois evoluindo para forma invasora dos tecidos submucosos. Entretanto, nem todos os carcinomas passam por todos esses estágios. As principais lesões bucais precursoras dos CCEB são placas brancas (leucoplasia), manchas vermelhas (eritroplasia) ou lesões vermelhas e brancas mistas (leuco-eritroplasia). A maioria das leucoplasias não mostra displasia e correspondem à categoria hiperplásica, hipotrófica, associadas ou não a um aumento na queratinização. Lesões mistas vermelhas e brancas (leucoplasia salpicada/ leuco-eritroplasia/ lesões não homogêneas) mostram uma maior frequência de displasia, muitas vezes de grau mais alto. A maioria das leucoplasias não sofrerá transformação maligna e pode até regredir particularmente se os fatores etiológicos aparentes forem removidos (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005; INCA, 2016).

A etiologia da leucoplasia tem sido considerada dentro do campo etiológico dos CCEB: o abuso de álcool e tabaco constituem-se os fatores mais frequentemente citados nesta relação, chegando a ser descrito em 80% de todos os casos. Todavia, casos associados ao uso do tabaco não fumado (tabaco mascado, por exemplo) têm sido também considerados. A descrição de casos de leucoplasia em pacientes sem aparente exposição a estes fatores causais, leva alguns autores a relatar que a exposição ao HPV pode também ser um fator relevante (RODRIGUES *et al.*, 2000; ARIYAWARDANA *et al.*, 2007; VAN DER WAAL *et al.*, 2010; DIONNE *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA & ARIYAWARDANA, 2016).

A transformação maligna das leucoplasias para CCEB tem sido um fato bem documentado há anos. Alguns estudos ainda afirmam que 0,13% a 36,4% de todas leucoplasia bucal (LB) sofrem

transformação maligna após um período de 1 a 11 anos (LEE *et al.*, 2006). Diferenças em relação ao tamanho da amostra, bem como os aspectos sócio-econômico-culturais entre as diversas populações estudadas, a localização das lesões, os desenhos de estudo utilizados e o tempo de acompanhamento dos pacientes são alguns dos fatores justificadores das variações dos índices de transformação encontrados (ARDUINO *et al.*, 2013).

Fatores preditivos da transformação maligna classicamente considerados são: sexo feminino, lesões de longa duração, incidência em pacientes não fumantes (ausência relativa de causa), lesões localizadas em língua e soalho bucal, dimensão acima de 200 mm², leucoplasias não homogêneas e a presença de displasia em diversos graus (BANOCZY & SIBA, 1976; LEE *et al.*, 2000; HOLMSTRUP *et al.*, 2006; VAN DER WAAL, 2009; ARDUINO *et al.*, 2013; DIONNE *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA & ARIYAWARDANA, 2016). Todavia, revisões criteriosas mostram que nenhum desses aspectos realmente são realmente definitivos nesta previsão (ARDUINO *et al.*, 2013).

Não obstante, a identificação e avaliação da displasia epitelial ainda permanecem como a melhor estratégia para prever transformação maligna e, com isso, o prognóstico dos pacientes (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; MEHENNA *et al.*, 2010; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2011, DIONNE *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA & AIYAWANANDRA, 2016). A percepção de uma gradual progressão das alterações morfológicas em células individuais da camada basal em direção a superfície, e da arquitetura do tecido epitelial, tem embasado a formulação de gradações das displasias, com objetivo de identificar seu relevante papel na predição da transformação maligna (MITHANI *et al.*, 2007; ARDUINO *et al.*, 2013).

Apesar dos critérios para o diagnóstico de LB preconizados pela OMS serem amplamente reconhecidos e aceitos, tais critérios apresentam uma importante variabilidade em análises comparativas inter e intra examinadores (GALE, *et al.*, 2005; EL NAGGAR & REICHART, *et al.*, 2005; KUJAN *et al.*, 2007). Vários autores concordam que essas variabilidades são atribuídas à subjetividade inerente a interpretação dos critérios utilizados na gradação da lesão, além de variabilidade nos critérios de amostragem das biopsias, e à utilização de procedimentos auxiliares para melhorar a precisão na identificação de lesões displásicas (GALE, *et al.*, 2005; EL NAGGAR & REICHART, *et al.*, 2005; KUJAN *et al.*, 2006; WARNAKULASURIYA *et al.* 2008).

Em vista disso, KUJAN *et al.*, 2006 propuseram e avaliaram um sistema binário de gradação baseado nos mesmos critérios citológicos e arquiteturais epiteliais estabelecidos pela

OMS para graduação das displasias em LB (GALE, *et al.*, 2005; EL NAGGAR & REICHART, *et al.*, 2005;). Nesta proposta, os autores procuram agrupar as alterações em displasia epitelial de baixo risco de transformação (DBR), e displasia epitelial de alto risco de transformação maligna (DAR). O objetivo, segundo os autores, era exatamente reduzir as categorias de gradação, para polarizar a interpretação, diminuindo a influência da subjetividade na categorização intermediária da displasia. Baseados na história de transformação maligna de uma série de casos de leucoplasias, e da expressão das alterações citológicas e arquiteturais epiteliais nestas lesões, os autores assim agruparam estas alterações afim de definir as categorias de risco já mencionadas: DAR: observação de, no mínimo, quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas; DBR: associada a observação de menos que quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas. Além disto, os autores, mostraram um alto nível de concordância na gradação dos patologistas bucais participantes na avaliação. Com esta proposta, foi possível identificar que aproximadamente 11,0% das lesões de baixo risco sofreram transformação maligna, enquanto que 28 lesões das 35 consideradas de alto risco (80,0%) transformaram-se em CCEB. Ou seja, pelo sistema binário, os autores puderam identificar uma maior associação entre transformação maligna e o grupo LAR, quando comparado com o grupo LBR. Os autores ainda identificaram valores de 0,85 de sensibilidade, 0,80 de especificidade, 82,0% de acurácia, e valores preditivos negativos e positivos da ordem de 85,0% e 80,0%, respectivamente.

O CCEB pode surgir em qualquer região da boca. O CCEB de lábio surge quase que exclusivamente no lábio inferior. Na boca, propriamente dita, as topografias mais afetadas incluem: dois terços posteriores da língua, incluindo face ventral e borda lateral, e assoalho da boca, mucosa jugal, gengiva inferior e superior e palato (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005). No Brasil, o assoalho bucal e a borda lateral da língua são os epicentros tumorais mais evidenciados na maioria dos estudos retrospectivos (DANTAS *et al.*, 2016).

Pacientes com CCEB em seus estágios iniciais apresentam-se na maioria das vezes assintomáticos ou com sinais e sintomas vagos. Se apresenta como alterações das mucosas na forma de placas assintomáticas não raspável com coloração variando de branca, vermelha e/ou mistas. No entanto, a maioria dos pacientes com lesões avançadas apresentam sinais e sintomas que podem variar de acordo com o subsítio intra-bucal afetado. As queixas comumente reportadas são crescimento da mucosa, ulceração, dor, dor referida para o ouvido, mau cheiro da boca, dificuldade em falar, em abrir a boca, e em mastigar, dificuldade e dor à deglutição, sangramento,

perda de peso, inchaço no pescoço (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005). Os casos de CCEB avançados apresentam como crescimentos ulcerativos com áreas de necrose e com invasão das estruturas circundantes, tais como o osso, músculo e pele. Nas fases terminais, os doentes podem apresentar-se com fístula oro-cutânea, hemorragia intratável, anemia grave e caquexia (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Como o CCEB apresenta uma variedade de expressões clínicas, o estadiamento clínico de acordo com a classificação TNM (T: tamanho do tumor; N: presença e extensão de metástase linfonodal; M: presença ou ausência de metástase à distância) desenvolvido pela Union Internationale Contre le Cancer (UICC) e da American Joint Committee on Cancer (AJCC) é indicado para classificar e segregar as lesões iniciais (Estádio I e II) das avançadas (Estádio III e IV) (GREENE, *et al.*, 2002; SOBIN & WITTEKIND, 2002; JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Histologicamente o CCEB apresenta-se como um crescimento celular desorganizado e invasivo demonstrando diferenciação escamosa, muitas vezes visto como queratinização individual ou em grupo de células, designadas pérolas córneas. A invasão se manifesta pela ruptura da membrana basal e extensão para o tecido conjuntivo subjacente e tecidos mais profundos, muitas vezes acompanhada de reação inflamatória estromal. Invasão angiolinfática e perineural são sinais adicionais de malignidade. Os tumores são tradicionalmente classificados nas categorias bem, moderadamente, e pouco diferenciados, dependendo de sua maior ou menor semelhança com o epitélio de origem. A lesão moderadamente diferenciada contém pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, incluindo mitoses anormais; existe geralmente menor queratinização. Nos pouco diferenciado, as células imaturas predominam, com numerosas mitoses típicas e atípicas, e mínima queratinização. Apesar de queratinização ser mais provável de se encontrar em tumores bem ou moderadamente diferenciados, tal critério não deve ser considerado como um importante fator histológico em para esta classificação (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005). A maioria dos CCEB se constitui de lesões moderadamente diferenciadas, de modo que a classificação por categorias de diferenciação tem realmente pouco valor prognóstico, quando comparado com outros critérios histológicos como 1- profundidade da invasão, 2-padrão da invasão e 3- invasão angio-linfática e/ou neural (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

A maioria dos casos de CCEB não apresenta dificuldade de diagnóstico para o patologista experiente. No entanto, o reconhecimento das primeiras fases de invasão pode ser problemático. Não há diretrizes consistentes para este diagnóstico. As camadas mais profundas do epitélio e a interface entre o epitélio e a lâmina própria precisam ser examinadas em detalhe. Este diagnóstico é frequentemente mais difícil quando existe um infiltrado inflamatório proeminente na região sub-epitelial, o que dificulta o discernimento dos limites epiteliais (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Até hoje não existe nenhum tratamento padrão específico para o CCEB, sendo que o objetivo dos tratamentos atualmente utilizados é de maximizar o controle locorregional e a sobrevida, associado a um dano funcional mínimo. As funções mais importantes que devem ser considerados quando se planeja o tratamento são deglutição, respiração e fala. Os CCEB devem ser tratados por especialistas, como parte de uma equipe multidisciplinar. A equipe deve incluir: um radiologista, um patologista, cirurgiões especialistas em cabeça e pescoço; maxilofaciais e plástico, um oncologista clínico, um dentista restaurador, um especialista clínico em enfermagem, um terapeuta da fala, um psicólogo, e da linguagem e um nutricionista (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Há pouca evidência de boa qualidade para ajudar a definir o melhor tratamento para cada sub-sítio tumoral. O maior ensaio clínico randomizado publicado comparando a sobrevida após a cirurgia e radioterapia pós-operatória *versus* radioterapia definitiva e quimioterapia concomitante tem seus resultados subestimados (SOO, *et al.*, 2005). Um grande número de série de casos de centros único não randomizados relata que o controle local, alta sobrevida e baixa morbidade são conseguidos com a ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia pós-operatória, mas isto não é prova de qualidade suficiente para suportar uma recomendação clara sobre a melhor modalidade para o tratamento do tumor primário (LAVERTU, *et al.*, 1988; MEDINI, *et al.*, 1988; EDWARDS & JOHNSON, 1999; MENDENHALL, *et al.*, 2000; ORUS, *et al.*, 2000; PAISLEY, *et al.*, 2002; PFREUNDNER, *et al.*, 2003; TSCHUDI, *et al.*, 2003).

A cirurgia pode ser o tratamento de escolha se o tumor primário pode ser retirado com uma margem de tecido normal adequado, sem resultar em comprometimento funcional. Dada a falta de provas de boa qualidade, a escolha da terapia local definitiva deve levar em conta: resultado funcional do tratamento, ressecabilidade do tumor, condição médica geral do paciente, e os desejos do paciente. Pode ser oferecido tratamento não-cirúrgico (radioterapia com ou sem quimioterapia)

aos doentes, visto que as taxas de sobrevivência são comparáveis com a ressecção cirúrgica (LAVERTU, *et al.*, 1988; MEDINI, *et al.*, 1988; EDWARDS & JOHNSON, 1999; MENDENHALL, *et al.*, 2000; ORUS, *et al.*, 2000; PAISLEY, *et al.*, 2002; PFREUNDNER, *et al.*, 2003; TSCHUDI, *et al.*, 2003).

O tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos cervicais são os fatores prognósticos mais significativos (PLATZ, *et al.*, 1985). Tumores invasivos com fronte coeso e limites bem definidos os quais empurram os tecidos adjacentes são menos agressivos do que os tumores que mostram um fronte com propagação difusa de pequenos fios ou células individuais (ANNEROTH, *et al.*, 1986; SHINGAKI, *et al.*, 1988; KIRITA, *et al.*, 1994; ACHARYA, *et al.*, 2013). Apesar disso, os principais fatores de risco que afetam adversamente o prognóstico são dois ou mais linfonodos regionais positivos, extensão extracapsular da metástase linfonodal, ou margens positivas após ressecção (LARAMORE, *et al.*, 1992; CANCER CARE ONTARIO PRACTICE GUIDELINES INITIATIVE, 2006; JAMADAR *et al.*, 2014). Outras características histológicas importantes associadas com mau prognóstico são a espessura tumoral e invasão neuro-vascular. Os únicos critérios histopatológicos com comprovada importância no prognóstico para o CCEB foram 1 -profundidade de invasão, 2-modo de invasão do fronte tumoral, conforme amplamente discutido pela literatura internacional (ANNEROTH, *et al.*, 1986; SHINGAKI, *et al.*, 1988; KIRITA, *et al.*, 1994; ACHARYA, *et al.*, 2013; JAMADAR *et al.*, 2014).

O CCEB apresenta uma alta taxa de morbidade e mortalidade e apesar das diferentes pesquisas e do avanço no campo da oncologia clínica e cirúrgica; o índice de mortalidade permanece inalterado nos últimos 50 anos (KANOJIA & VAIDYA, 2006). Ações para controlar os fatores de risco, bem como o exame clínico feito por profissionais de saúde capacitados, são consideradas as melhores formas de diminuir a incidência e a mortalidade da doença. A identificação de lesões precursoras ou do CE em estágios iniciais possibilita um melhor tratamento, com menos agressividade e, conseqüentemente, garantindo uma melhor sobrevida. (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005; INCA 2016)

No Brasil, a detecção do CCEB é normalmente realizada em estágios avançados da doença em razão da ausência de sintomatologia nos estágios iniciais (BAGAN, SARRION & JIMENEZ, 2010; LEEMANS, BRAAKHUIS & BRAKENHOFF, 2011.) e do atraso do paciente e do profissional, que podem contribuir para o atraso no diagnóstico da lesão (FARIA *et al.*, 2005).

Existe alguma variação no perfil genético do CCEB e do carcinoma de células escamosas orofaringiano, que reflete o impacto específico do local e de vários agentes casuais, bem como diferenças na apresentação clínica. Os agentes carcinógenos do tabaco, por exemplo, aumentam a prevalência e o espectro de mutações em TP53 (BRENNAN, *et al.*, 1995). Em contraste com os carcinomas que surgem em pacientes que fumam, os carcinomas de pacientes que nunca fumaram apresentam menores índices de mutações do gene TP53 (KOCH, *et al.*, 1999). Para carcinomas da orofaringe, o vírus do papiloma humano (HPV), particularmente o subtipo HPV-16, é um importante agente causador. Mais de 50% de carcinomas de orofaringe abrigam tal DNA viral integrado ao seu genoma (ANDL, *et al.*, 1998; GILLISON, *et al.*, 2000). As oncoproteínas virais E6 e E7 ligam e inativam os produtos dos genes TP53 e *retinoblastoma*, respectivamente, desengatando duas das vias mais críticas envolvidos na regulação do ciclo celular (WIEST, *et al.*, 2002). Estes tumores HPV-positivos compõem uma entidade patológica distinta com seu próprio espectro clínico e morfológico (ANDL, *et al.*, 1998; GILLISON, *et al.*, 2000; WIEST, *et al.*, 2002), que ilustra o papel emergente da caracterização genética como um meio potencial de determinar o prognóstico e influenciar o tratamento.

Diversas alterações genéticas foram mapeadas no desenvolvimento e progressão dos CCEB e incluem desde a ativação de proto-oncogenes (por exemplo, o CDKN2A, o MYC, o RAS, o PIK3CA, e o EGFR), até a inativação de genes supressores tumorais (por exemplo, o p16INK4A, o TP53, e o PTEN); entretanto, essas alterações são complexas e, na maioria das vezes, não estão inter-relacionadas. Embora existam progressos consideráveis na compreensão dos acontecimentos genéticos e moleculares subjacentes a progressão de lesões cancerizáveis para carcinomas invasivos, isso ainda não foi traduzido em novas estratégias terapêuticas. Até mesmo marcadores moleculares com significância prognóstica inequívoca ainda não foram identificados (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Dessa forma, estudos buscando marcadores específicos capazes de auxiliar na predição da evolução da história natural dos CCEB (desde de sua evolução a partir de uma leucoplasia até a formação dos nichos metastáticos) são necessários atualmente, para o estabelecimento de novas estratégias diagnósticas, bem como administração de um tratamento mais adequado para cada tipo de paciente de forma precoce e efetiva.

1.2. Carcinoma de células escamosas bucal experimental

A indução de tumor em cavidade bucal em roedores por substâncias carcinogênicas tem sido frequentemente relatada na literatura (DAYAN *et al.*, 1997; KANDARKAR *et al.*, 1998; IDE *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2016; BAUMAN *et al.*, 2016; VIARISIO *et al.*, 2016; OGHUMU *et al.*, 2016). Tais técnicas ganharam bastante popularidade desde sua primeira utilização por Salley em 1954. A aplicabilidade desses modelos tem contribuído para o conhecimento das bases moleculares e bioquímicas do CCEB, pois tais métodos produzem um espectro de alterações moleculares e fenotípicas admitidamente similares as encontradas nos tumores de seres humanos. Entre estas alterações incluem: mutações e/ou alteração na expressão de genes específicos ligados a diferenciação e ao controle do ciclo celular, mudanças no padrão de maturação epitelial e desregulação da proliferação celular (CHAN & READE, 1998; SHKLAR, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 2000; WANI *et al.*, 2001).

Diferentes trabalhos sobre carcinogênese experimental bucal foram publicados, embora estes apresentem grandes diferenças em relação ao tipo, forma e tempo de aplicação do carcinógeno. Ademais diversas espécies animais já foram empregadas, com resultados bastante divergentes, demonstrando que algumas linhagens de animais são mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias que outras (STEIDLER & READE, 1986; HAWKINS *et al.*, 1994). Dentre todas as substâncias carcinogênicas conhecidas, duas se destacam como as mais empregadas: o 7,12 dimetilbenzoantraceno (DMBA) e o 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO). Apesar de quimicamente distintas, ambas as substâncias produzem alterações neoplásicas quando aplicadas topicamente (CHEN *et al.*, 2002). Entretanto, alguns autores acreditam que lesões induzidas pelo 4NQO apresentam vantagens significativas quando comparadas às lesões induzidas pelo DMBA, principalmente no que tange aos estudos dos eventos moleculares associados ao processo de transformação neoplásica a partir do tecido normal (HAWKINS *et al.*, 1994).

Como desvantagem, a inflamação e necrose que surgem concomitantemente à aplicação do DMBA, dificultam a distinção do que são alterações epiteliais decorrentes de transformação neoplásica verdadeira daquelas relativas a uma reatividade celular de origem inflamatória (HAWKINS *et al.*, 1994; KANDARKAR *et al.*, 1998). Somado a isso, tem-se que os carcinomas induzidos pelo DMBA em hamster geralmente são muito anaplásicos, enquanto que os tumores induzidos pelo 4NQO são bem diferenciados. Além disto, a sequência de estágios histológicos no desenvolvimento do câncer experimental com 4NQO, a saber, hiperplasia, displasia, Carcinoma *in*

situ e carcinoma invasivo são similares aquelas identificadas na carcinogênese humana. Esta sequência não tem sido relatada com frequência na carcinogênese experimental com o DMBA (IDE *et al.*, 2001; VERED *et al.*, 2005).

Embora o modelo 4NQO seja o melhor entre os sistemas experimentais disponíveis para estudos sequenciais da carcinogênese bucal, tal método também apresenta várias limitações (NAUTA *et al.*, 1995). CCEB desenvolvidos pelo modelo do 4NQO tendem a ser altamente diferenciados e pouco agressivos. No entanto, na carcinogênese humana, é usual encontrarmos uma variedade de progressão maior em relação à diferenciação das lesões, apresentando-se clinicamente mais agressiva. O CCEB humano apresenta alto índice de metástases para os linfonodos regionais, no entanto o modelo do 4NQO, mesmo em altas concentrações raramente provoca metástases. O crescimento perineural é incomum em CCEB humanos sendo, no entanto, comumente observada em modelo do 4NQO. Usualmente, o CCEB humano é unifocal, enquanto aquele induzido no pelo 4NQO gera inúmeras lesão na língua, e até mesmo no esôfago. Apesar de todas essas limitações, o modelo de carcinogênese bucal induzido por 4NQO ainda se constitui um dos modelos mais extensivamente estudados, principalmente em razão da estreita semelhança com a boca humana e sua capacidade de imitar a carcinogênese bucal humana (NAUTA *et al.*, 1995; IDE *et al.*, 2001; VERED *et al.*, 2005; KANOJIA & VAIDYA, 2006).

Acredita-se que os efeitos carcinogênicos do 4NQO sejam decorrentes da redução enzimática do seu grupo nitro presente em seus anéis aromáticos, seguida da formação de um composto intermediário conhecido como 4hidroxiaminoquinolona-N-óxido (4HAQO) (MIRZAYANS *et al.*, 1999; STANLEY *et al.*, 1992). Estudos *in vitro* têm mostrado que o 4HAQO induz um forte estresse oxidativo intracelular com a geração de espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais, se acredita, sejam os responsáveis pela formação de adutos no DNA (NUNOSHIBA & DEMPLE, 1993; IDE *et al.*, 2001; KANOJIA & VAIDYA, 2006). Somado a isso, tem-se que o 4HAQO pode também ser metabolizado e acetilado pela enzima serilrRNAsintetase e formar um complexo chamado complexo serilAMPenzima, o qual tem a capacidade de introduzir grupos quinolonas dentro do DNA, potencializando ainda mais o dano ao material genético (MIRZAYANS *et al.*, 1999; KANOJIA & VAIDYA, 2006). Ademais, o 4HAQO reage preferencialmente aos resíduos de guanina do DNA promovendo a substituição desta por pirimidina, num padrão semelhante ao observado pelos raios ultravioletas do sol e por alguns compostos presentes no tabaco (KANOJIA & VAIDYA, 2006).

O uso do 4NQO em mucosa bucal foi descrito pela primeira vez por Fujino *et al.*, em 1965, os quais induziram carcinomas em lábio de murinos após a aplicação tópica de 4NQO. Desde então, o 4NQO tem sido extensivamente usado para indução de CCEB em língua, palato, bolsa bucal e esôfago de diferentes grupos de animais (STEIDLER & READE, 1986; NAUTA *et al.*, 1995; DAVIES *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2002).

A susceptibilidade a carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO é muito variável entre as espécies de roedores e, em geral, ratos são mais susceptíveis do que os hamsters (IDE *et al.*, 2001). Por outro lado, poucos trabalhos utilizam camundongos, mas estudos com esses animais indicam que nessa espécie de roedores é também possível induzir lesões displásicas e carcinomas (IDE *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2004; FARIA *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2014).

Várias foram as constatações obtidas sobre a biologia tumoral a partir desses experimentos: a) evidências de que as alterações microscópicas e clínicas são precedidas por alterações moleculares e nucleares; b) o processo de carcinogênese ocorre em várias fases; c) a fase de iniciação da tumorigênese é um evento relativamente raro enquanto que na fase de promoção o efeito é mais prolongado, mas parcialmente reversível; d) os efeitos da carcinogênese estão diretamente relacionados ao tempo de exposição e a concentração das substâncias carcinogênicas; e) as alterações displásicas são lesões cancerizáveis capazes de progredirem a CE e, por fim, f) a saliva exerce um efeito protetor para as mucosas (STEIDLER & READE, 1986; HAWKINS *et al.*, 1994; DAYAN *et al.*, 1997; VERED *et al.*, 2005)

Nesse sentido, Steidler & Reade (1986) observaram que a exposição crônica *ad libitum* da mucosa palatina ao 4NQO (0,5% em propilenoglicol) pelo período de duas a 16 semanas, induziu alterações arquiteturais progressivas dependentes do tempo de aplicação. Eles notaram que o CCEB desenvolveu em 50% e 100% dos camundongos tratados por seis e 16 semanas, respectivamente. No entanto, nos camundongos tratados por duas e quatro semanas, apenas áreas focais de hiperqueratose e atipia leve (30%) foram observadas. Diferente disso, Rich, Reade (1996) e Kandarkar *et al.* (1998), utilizando o mesmo modelo, observaram uma incidência superior a 60% e 100% de displasia leve ao final do período de quatro semanas, respectivamente. Vale salientar que, em ambos os estudos, todos os ratos tratados com 4NQO desenvolveram CCEB ao final do experimento. Esses achados preliminares permitiram afirmar que as incidências de displasia epitelial e de carcinomas são dependentes da duração do tratamento com carcinógeno.

Em outro estudo utilizando o mesmo protocolo de aplicação do 4NQO, Hawkins *et al.* (1994) constataram que a susceptibilidade a ação de carcinógenos químicos é provavelmente distinta para os diferentes sítios da mucosa bucal. Camundongos tratados por 16 semanas e analisados em intervalos regulares até o final do experimento (49^o semana) desenvolveram progressivamente tumores na taxa de 20%, 40% e 100% dos camundongos acometidos por carcinomas na 28^o, 33^o e 49^o semana, respectivamente. Todos os carcinomas ocorreram em língua e não em mucosa de palato. Segundo os autores, essa constatação sugere que a mucosa palatal, tanto em camundongos e humanos, pode ser mais resistente à ação de carcinógenos em relação à mucosa lingual. Além disso, a ausência de inflamação e necrose nos fragmentos analisados levaram-lhes a interpretar que as alterações detectadas microscopicamente seriam decorrentes apenas da ação do 4NQO sobre as células epiteliais.

Diferentemente da aplicação tópica de 4NQO que está vinculada a baixa produção de tumores e um tempo muito grande para sua indução, a ingestão do carcinógeno diluído em água, alternativamente, mostrou-se mais eficaz, tanto pelo maior número de lesões produzidas, quanto pela redução do tempo para sua formação (KAPLAN *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2004). Nesse sentido o artigo de Tang *et al.*, 2004, demonstraram a incidência de tumores em camundongos C57BL/6 e CBA recebendo 4NQO diluído em água (100ug/ml) ou pincelado (0,5%) três vezes ao dia, por 16 semanas. Ao final de 28 semanas, 100% dos animais que receberam o carcinógeno diluído na água de beber desenvolveram tumores, um valor muito superior aos 5% de lesões produzidas pelo pincelamento.

Esses resultados indicam que o melhor modelo para indução de tumor em cavidade bucal, considerando tempo de indução e incidência, é aquele que usa o 4NQO diluído em água. Além disso, outros fatores inerentes à técnica de aplicação do carcinógeno, como dificuldade de acesso ao sítio anatômico de aplicação, riscos de contaminação e acidentes durante a manipulação do animal, contribuíram para o uso sistemático de 4NQO na água de beber (DAYAN *et al.*, 1997).

Atualmente, conta-se mais de 150 artigos publicados utilizando 4NQO como carcinógeno indutor para a formação de displasias e carcinomas em mucosas de animais experimentais, a maioria destes trabalhos focou na descrição das características moleculares dos tumores induzidos, bem como no potencial quimioprotetor de diversas substâncias (BAUMAN *et al.*, 2016; OGHUMU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Nesse sentido, poucos trabalhos têm desenvolvido estudos sobre carcinogênese bucal usando camundongos *knockout* (IDE *et al.*, 2001; IDE *et al.*,

2003; FARIA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2016). Essas abordagens são extremamente importantes porque dá subsídios *in vivo* para a compreensão do papel de uma determinada gene/proteína e sua via de sinalização no processo de desenvolvimento e progressão tumoral. Como exemplo, pode ser citado estudo realizado por nosso grupo utilizando camundongos *knockout* para galectina-3 desafiados com o carcinógeno 4NQO diluído em água. Nesse estudo ficou evidente que a ausência da galectina-3 não interfere no processo de carcinogênese bucal (FARIA, *et al.*, 2011). Outro exemplo é o recente trabalho publicado por Zhang *et al.*, 2016, os resultados deste estudo sugerem que a proteína PRX1 suprime a apoptose induzida pelo estresse oxidativo através da via de sinalização ASK1 / p38 em lesões cancerizáveis da língua de camundongos. Em conclusão, PRX1 tem um papel de coordenação da promoção da progressão das lesões cancerizáveis da mucosa da língua. Considerando a importância de se estudar o papel isolado de moléculas na formação de tumores *in vivo* e, nesse caso, na carcinogênese bucal, o óxido nítrico (NO) é forte candidato.

1.3. NO e a enzima óxido nítrico sintase induzível

O NO é um mensageiro intracelular que está primariamente relacionado com a resposta imunológica, além de estar envolvido em mecanismos regulatórios neuronais e cardiovasculares. Ele é produzido por um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases, do inglês “*nitric oxide synthase*” (NOS) (BREDT *et al.*, 1990). Das três isoformas, a óxido nítrico sintase induzível (do inglês “*inducible nitric oxide synthase*”, iNOS) é uma das enzimas mais estudadas por estar envolvida em processos inflamatórios, levando a formação de elevados níveis de NO, o qual participa de diferentes mecanismos de sinalização intracelular e na formação de espécies reativas durante o estresse oxidativo (LEONARD *et al.*, 1998).

No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos entre a produção de NO e a regulação do crescimento celular ainda permanecem desconhecidos. Sabe-se que a interação entre a iNOS e as vias de sinalização I κ B kinase (IKK) / factor nuclear kappa B (NF-kappaB) e RAS/ extracellular signal-regulated kinases (ERK) induzem a expressão das diferentes moléculas reguladoras positivas do crescimento celular (CALVISI *et al.*, 2007; CALVISI *et al.*, 2008; FEO *et al.*, 2008). A premissa anterior já foi demonstrada em camundongos deficientes da enzima iNOS, em que a atividade do NF-kappaB apresentou-se reduzida em relação aos camundongos selvagens

(ZINGARELLI *et al.*, 2002). Portanto, pode-se alegar que a iNOS está incluída entre os mediadores intracelulares que induzem a expressão de moléculas reguladores do crescimento celular.

Entre as diversas moléculas relacionadas com crescimento celular e carcinogênese que são induzidas pelo NF-kappaB e pela via RAS/ERK, o c-MYC é uma das mais estudadas (LIN *et al.*, 2000; ELOUIL *et al.*, 2005; CALVISI *et al.*, 2007). Quando ativado, esse fator de transcrição induz a proliferação celular, aumentando a expressão das ciclinas e reduzindo a expressão da p21 (SOUCEK *et al.*, 2008). Pesquisadores já demonstraram em experimentos *in vitro* que o estresse oxidativo provocado por espécies reativas, entre elas o NO, induz a expressão de c-MYC em células de câncer de mama (RUIZ-RAMOS *et al.*, 2009). Ademais, essa molécula é considerada um fator que predispõe ao desenvolvimento de carcinomas a partir de uma lesão displásica (VAIRAKTARIS *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2009). Em outros tipos de cânceres, como no hepatocarcinoma, o c-MYC está relacionado com prognóstico ruim (FEO *et al.*, 2008). Mediante os dados acima, pode-se concluir que o c-MYC tem relação com o desenvolvimento e invasividade do carcinoma, mas a literatura não mostra uma interação clara entre a expressão de iNOS e produção do NO com a amplificação do *c-MYC*.

Outra molécula relacionada com o desenvolvimento de tumores e que tem sido relatada interferir na expressão de iNOS é a proteína p53, a qual é responsável por regular o ciclo celular, apoptose e angiogênese (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1995; LACROIX *et al.*, 2006). Em condições de estresse intracelular e dano ao material genético, a proteína p53 ativa uma série de sinais intracelulares que podem interromper o ciclo celular e, por consequência, ativar a maquinaria do sistema de reparo, ou induzir apoptose, caso não seja possível reparar o dano ao DNA (HUSSAIN & HARRIS, 2006). Por outro lado, nessas mesmas condições de estresse oxidativo, como visto, por exemplo, em doenças inflamatórias crônicas (colite ulcerativa, hemocromatose, doença de Wilson) o aumento de espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio, como o NO, está relacionada com aumento de mutação no gene *TP53* (HUSSAIN & HARRIS, 2006).

Diversos estudos têm mostrado que a presença do gene *TP53* mutado e consequente acúmulo intracelular da proteína p53 mutante está diretamente associada com carcinogênese e progressão tumoral (FENG *et al.*, 2002). Essas observações são consistentes com a presença do gene *TP53* mutado em mais de 50% das neoplasias em humanos, especialmente mutação de troca de base C:G → T:A em ilhas CpG chamadas *hotspots*, nas quais o NO pode ser responsável, seja direta ou indiretamente, inibindo os mecanismos de reparo de DNA (VERED *et al.*, 2005).

Corroborando tal observação, Feng *et al.* (2002) mostraram uma associação estatisticamente significativa entre acúmulo da proteína p53 e expressão de iNOS em amostras de tumores gástricos, indicando que ambas as moléculas são importantes biomarcadores de agressividade para esses tumores. Dados similares também têm sido encontrados para carcinomas de pulmão, cólon, mama e boca (AMBS *et al.*, 1999; LAZZARO & CLEVELAND, 2000).

Segundo Isaac *et al.* (2012), níveis elevados de NO e iNOS encontrados dentro do microambiente tumoral são características importantes para a progressão desta lesão. Seus resultados indicam que a expressão ectópica de iNOS em células de câncer de próstata aumentou a extensão da migração celular, o que pode ser bloqueado por bloqueadores ITGα6 seletivos ou anticorpos inibidores de iNOS. Além disso, iNOS pode causar S-nitrosilação de Cys86 da proteína ITGα6 em células de câncer de próstata. Finalmente, a S-nitrosilação de ITGα6 enfraquece a sua ligação à laminina-β, fragilizando a adesão de células do cancer da próstata com os estroma. Em conclusão, S-nitrosilação de ITGα6 aumentou a extensão da migração de células de câncer da próstata, através de NO induzido por iNOS.

Ademais, segundo Papaevangelou *et al.*, 2016, a inibição da produção de NO através da inibição da expressão de iNOS em células de gliomas (linhagem C6) levou a um atraso significativo no crescimento e a inibição da maturação dos vasos. Estes dados sugerem que a iNOS derivada das células tumorais é um importante mediador do crescimento e da maturação dos vasos, por conseguinte, um alvo promissor para terapias anti-cancerosas vasculares.

Recentemente, em um estudo proposto por Gao, *et al.*, 2016, foi examinada a associação entre a metilação do DNA de quatro genes do estresse oxidativo e a incidência de câncer. A metilação do DNA promotor do *CRAT*, *iNOS*, *OGGI* e *GCR* em leucócitos do sangue foi medida usando piro-sequenciamento. A metilação de *OGGI* foi associada com maior risco de incidência de cânceres (HR: CI 1,43, 95%: 1,15-1,78). Comparados os participantes livres de câncer com aqueles que eventualmente desenvolveram câncer, observou-se elevada metilação em *CRAT* (p = 0,04) e baixa metilação em *iNOS* (p <0,01).

Dessa forma, a metilação *CRAT* foi associada com maior incidência de todos os cânceres (HR: CI 3,88, 95%: 1,06-14,30), enquanto baixa metilação de *iNOS* foi associado com menor incidência de todos os cânceres (HR: 0,08, 95% CI 0,02-0,38). Tais resultados sugerem que a metilação e a sua mudança dinâmica ao longo do tempo pode desempenhar um papel importante na carcinogênese. Estes resultados podem potencialmente facilitar o desenvolvimento de

biomarcadores de detecção precoce e de novos tratamentos para uma variedade de neoplasias malignas.

1.4. iNOS X carcinoma de células escamosas bucal

Nos últimos anos tem surgido um grande interesse nos mecanismos de sinalização intracelular relacionados com carcinogênese induzida pelo NO. Um dos motivos de interesse por essa molécula bem como a iNOS é a presença dessa em lesões primárias de câncer de cabeça e pescoço (CONNELLY *et al.*, 2005; BRENNAN *et al.*, 2008), bem como sua maior expressão em CCEB com metástases para os linfonodos (BRENNAN *et al.*, 2008). Um grande número de atividades mediadas pelo NO pode contribuir para a carcinogênese, entre elas a indução de dano celular, o aumento da angiogênese via regulação positiva de VEGF, redução na apoptose, supressão do sistema imune e mutação do gene *TP53* (AMBS *et al.*, 1998a; AMBS *et al.*, 1998b; ZIOBER *et al.*, 2006; HUSSAIN & HARRIS, 2007).

Diferentes estudos demonstraram que a inibição da expressão da iNOS contribui para a inibição do crescimento das células de carcinoma bucal em modelos *in vivo* e *in vitro* (CHEN *et al.*, 2005; BRENNAN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008). Tal afirmação foi confirmada clinicamente por Brennan (2008) e Sappayatosok (2009) que correlacionaram a expressão da iNOS com metástase de células dos carcinomas para os linfonodos regionais em humanos. Similarmente Varghese *et al.*, em 2010 demonstram que o aumento ordenado na expressão do iNOS a partir do tecido normal, através das lesões cancerizáveis até os CCEB sugere um papel essencial desempenhado pela iNOS na transformação epitelial e na formação e progressão tumoral.

Coincidentemente, foi demonstrado uma forte associação entre a expressão de p53 e iNOS, em nível protéico e RNAm, em amostras tumorais induzidas em bolsa bucal de hamsters desafiados com carcinógeno DMBA, indicando uma forte relação entre a expressão de ambas as proteínas e carcinogênese bucal (CHEN *et al.*, 2003). Esses achados vêm de encontro com um trabalho anterior que encontrou uma alta frequência de mutação no gene *TP53* e da proteína em amostras de bolsa bucal de hamster desafiados com carcinógeno (CHANG *et al.*, 2000). Além disso, essa observação permite inferir que o aumento da expressão da proteína p53 pode ser decorrente do aumento dos níveis da forma mutada de p53, visto que os níveis de NO estavam elevados, indicando uma perda

da regulação do gene *iNOS* pela proteína p53 selvagem (FORRESTER *et al.*, 1999; CHEN *et al.* 2003).

Similarmente, outro estudo revelou um aumento na expressão por imunohistoquímica da proteína iNOS (variando de 10% para tecido epitelial normal a 35% em carcinomas) em um modelo de carcinogênese bucal induzido pelo 4NQO em língua de ratos Wistar, sugerindo que a expressão de iNOS está associada ao desenvolvimento de carcinomas, bem como sua progressão (RIBEIRO *et al.*, 2007). De fato, esses achados corroboram a influência do NO bem como da iNOS no desenvolvimento e progressão do CCEB (FORRESTER *et al.*, 2000). Nesse estudo, os autores mostraram que tanto o NO administrado exogenamente em cultura de fibroblastos bem como fibroblastos super-expressando iNOS apresentaram um acúmulo intranuclear da proteína p53. Nesse mesmo estudo, os autores mostraram ainda que a forma selvagem da proteína p53 reprimiu a expressão da proteína iNOS e, por consequência, a produção de NO, sugerindo um *feedback* negativo entre iNOS e p53 selvagem. Até o presente momento, não há estudos *in vivo* analisando o processo de carcinogênese bucal em camundongos *knockout* para iNOS. Um estudo dessa natureza, permitirá elucidar de fato como a ausência de iNOS e, por consequência, uma ausência das vias indutoras de estresse oxidativo, poderá interferir na carcinogênese.

Outra molécula que está diretamente envolvida com desenvolvimento e progressão tumoral é o VEGF, a qual apresenta um importante papel nos mecanismos fisiológicos que regulam a angiogênese e vasculogênese (MAEDA *et al.*, 1996). Entre os membros da família do VEGF (A, B, C, D e fator de crescimento placentário), o VEGF-A tem papel específico na indução de efeitos mitogênicos especificamente sobre células endoteliais, além de inibir a apoptose através da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como bcl-2 e A1, e influenciar nos processos de migração de diferenciação dessas células (FERRARA *et al.*, 2007; HO & CUO 2007). Por causa disso, VEGF-A é considerada um importante fator regulador da homeostasia de vasos sanguíneos de uma ampla variedade de tecidos (MAHARAJ *et al.*, 2006).

Inúmeras evidências têm mostrado que a angiogênese é um dos eventos mais importantes para o crescimento tumoral, desenvolvimento de metástases e sobrevida de células tumorais (FOLKMAN *et al.*, 1989; MAZUREK *et al.*, 2006). Contudo, embora extensivamente estudada, os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento de vasos sanguíneos tumorais bem como suas funções permanecem elusivos (KOSTOUROU *et al.*, 2011). Não obstante, em muitos tumores sólidos, uma alta expressão de VEGF tem sido observada e, por conseguinte, considerada

um importante marcador de metástase e prognóstico (MAEDA *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1997). Nesse sentido, CCEB, esôfago, estômago e pulmão estão entre os tipos de neoplasias malignas cuja expressão de VEGF tem sido associada com metástases à distância e locorregional, bem com o prognóstico ruim (DU *et al.*, 2003; SHANG & LI, 2004; SHANG *et al.*, 2007). Em amostras de carcinomas gástricos em estágios iniciais, por exemplo, foi mostrado que a expressão de VEGF foi significativamente maior no subtipo penetrante do que no subtipo disseminação superficial, estando isso também associado à alta densidade microvascular naqueles (ICHINOE *et al.*, 2004).

Recentes estudos têm indicado que a iNOS e especificamente o seu subproduto, NO, apresenta importante papel no desenvolvimento de vasos sanguíneos intra-tumorais provavelmente através da indução do crescimento de células endoteliais e também via regulação do fluxo sanguíneo (ZICHE *et al.*, 1997). Contudo, o seu preciso papel ainda é elusivo e a sua função parece estar na dependência de sua atividade, concentração, duração de exposição e, por fim, sensibilidade intrínseca das células ao NO (FUKUMURA *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* têm observado que células DLD-1 de carcinoma de cólon super-expressando iNOS desenvolvem uma rica vasculatura se comparada com o subtipo selvagem (CULLIS *et al.*, 2006). Não obstante, alguns grupos de pesquisa têm deslocado esforços na busca pelo entendimento de como o NO pode desencadear o mecanismo de angiogênese. Nesse sentido, alguns trabalhos têm mostrado que a expressão de VEGF e a angiogênese mediada por esse fator de crescimento está na dependência da produção de NO via enzima iNOS, requerendo para isso, ativação da via de sinalização NO/cGMP no interior das células endoteliais (JENKINS *et al.*, 1995; MUNTANÉ *et al.*, 2010). Um segundo mecanismo regulatório de VEGF foi descrito por Mukhopadhyay *et al.* (1995). Nesse estudo, os autores mostraram que a proteína p53 selvagem transfectada em células 293, mas não a mutante, suprimiu os efeitos da expressão do gene *VEGF*, demonstrado pelos níveis de RNAm, e que isso estava relacionada com a inibição da atividade do sítio promotor desse gene.

Em relação ao papel do VEGF na carcinogênese bucal experimental, assim como da co-participação do VEGF e iNOS nesse processo, não há nenhum trabalho na literatura inglesa estudando o papel de ambas proteínas em modelos de camundongos desafiados com o carcinógeno 4NQO. Contudo, há apenas um trabalho de origem chinesa que estudou a expressão por imunohistoquímica dessas duas proteínas em um modelo de carcinogênese bucal em bolsa bucal de hamster (YANG *et al.*, 2006). De acordo com os dados apresentados nesse estudo, foi possível

notar que o número de camundongos expressando as proteínas VEGF e iNOS de fraca a forte intensidade na mucosa aumentou entre a sexta e 16ª semana no grupo experimental, quando comparado com o grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Isso corrobora os achados de Nishikawa *et al.* (2004) que encontraram uma alta expressão de *VEGF/RNA* em tumores sólidos oriundos de camundongos selvagem para *NOS2* se comparada com o grupo deficiente para essa enzima. Nesse mesmo estudo, eles mostraram que o aumento do tamanho dos tumores em camundongos selvagens foi significativamente maior quando comparado com o grupo deficiente para *NOS2* e que isso estava relacionado com o aumento de VEGF bem como de iNOS e NO.

Em 2009, Mozet *et al.* propuseram um estudo com o objetivo de estudar a imuno-marcação de óxido nítrico sintase endotelial (do inglês “*endothelial nitric oxide synthase*”, eNOS) e iNOS em mucosa bucal e em CCEB, na tentativa de correlacionar os resultados com fatores do estadiamento clínico (TNM). Na mucosa bucal, iNOS só foi expressa nas camadas epiteliais basais. Em contraste, ambas as isoformas de NOS foram expressas no CCEB com preferência para as margens do tumor. 64% das espécies de tumores demonstraram imuno-reatividade para eNOS, e 55% para iNOS. As taxas de expressão da proteína iNOS alcançou escores mais elevados em tumores de pacientes com metástases em linfonodos. Levando os autores a concluir que ambas as isoformas da proteína são encontradas em quantidades elevadas no CCEB. Os autores presumiram que o NO sintetizado é capaz de suportar atividades angiogênicas e facilitar a progressão tumoral e disseminação linfática.

Em um estudo proposto por Meric *et al.*, em 2012, as imuno-marcações de p65, NF-kB, p38, MAPK e iNOS foram significativamente maiores no grupo de fumantes em comparação com os de não-fumantes ($p < 0,001$). Da mesma, forma este mesmo trabalho aponta que a expressão do iNOS, p65 e NF-kB em fumantes pesados foi significativamente maior, quando comparadas com as de fumantes leves.

Karthik *et al.*, em 2014, propuseram um estudo para avaliar a correlação entre o uso de tabaco e a expressão de iNOS em amostras de CCEB, a fim de conhecer sua relação no processo de carcinogênese. Os resultados mostraram aumento da expressão do iNOS em usuários habituais de tabaco, em comparação aos não-usuários. Os resultados do presente estudo indicaram uma expressão aumentada de iNOS em carcinomas de usuários de tabaco, quando comparados aos do

grupo de lesões bucais provenientes de pacientes não-tabagistas. Dessa forma, os compostos químicos cancerígenos do tabaco podem induzir a produção de óxido nítrico por iNOS.

Recentemente, Mastragelo *et al.* (2014) observaram a atividade de NOS na patogênese de lesões orais cancerizáveis e malignas. Os resultados mostraram alterações nos níveis de expressão da enzima eNOS, os quais aumentaram da mucosa bucal saudável para o CCEB, passando por níveis intermediários nas displasias. Os níveis de atividade da iNOS aumentaram em lesões cancerizáveis em comparação com mucosa saudável, onde iNOS estava ausente, enquanto diminuiu no CCEB. Além disso, um aumento gradual da atividade de óxido nítrico sintase neuronal (do inglês “*neuronal nitric oxide synthase*”, nNOS) em conjunto com a progressão das lesões foi também encontrada. Estes resultados sugeriram que NO desempenha papel crítico durante a patogênese, o crescimento e a progressão de lesões cancerizáveis até suas transformação maligna.

No estudo proposto por Hsieh *et al.* (2015), a droga dehydroandrographolide (um inibidor de iNOS) induz a morte de células de cancer bucal, por meio da ativação de autofagia. Além disso, essa mesma droga reduz a expressão de p53, de forma dependente da concentração. Ademais, a dehydroandrographolide induziu autofagia e diminuiu a viabilidade celular através da modulação da expressão da p53. A autofagia induzida pela dehydroandrographolide foi provocada por uma ativação de JNK1 / 2 e uma inibição de Akt e p38. Finalmente, uma administração de dehydroandrographolide suprimiu eficazmente a formação de tumor no modelo in vivo de xenoinxerto de carcinoma bucal. Este é o primeiro estudo a revelar a nova função da dehydroandrographolide em ativar a autofagia, sugerindo que esta droga pode servir como um novo e potente agente quimiopreventivo para tratar o câncer bucal em humanos.

Yang *et al.*, 2015 demonstraram em seus resultados que a expressão de iNOS e p53 foi significativamente correlacionada com fases de tumor e grau patológico de CCEB ($p > 0,05$). Em contraste, não houve correlação entre a expressão iNOS e p53 *versus* metástases em linfonodos ($P < 0,05$). A taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer foi negativamente associada à expressão de iNOS, mas não à de p53. Um aumento significativo na expressão de p53 foi observada quando a expressão de iNOS foi impedida. Por fim estes autores confirmaram que imunoexpressão de iNOS está correlacionada com tumorigênese e prognóstico do CCEB e pode servir como um marcador de prognóstico.

Assim, diante de tudo que foi descrito anteriormente, nossa hipótese é de que a enzima iNOS pode influenciar o desenvolvimento e progressão do CCEB. Em razão de que já existem

dados sobre a super-expressão de iNOS em amostras de LB e de CCEB, no parece racional investigar de forma mais profunda tal inter-relação. Portanto, a indução da carcinogênese em camundongos deficientes de iNOS possibilitará elucidar um dos possíveis mecanismos que podem promover o desenvolvimento de carcinomas de cavidade bucal.

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral:*

Avaliar o papel da enzima iNOS no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal humano e naquele obtido por indução experimental em modelo murino de carcinogênese lingual.

2.2. *Objetivos Específicos:*

1.0. Avaliar os seguintes fatores durante a carcinogênese experimental: 1- Volume hídrico consumido semanalmente; 2- Peso total e hepático no momento do sacrifício; 3. Mortalidade e sobrevida global;

2.0. Avaliar e analisar comparativamente as lesões linguais identificáveis macroscopicamente na carcinogênese experimental nos animais *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}.

3.0. Avaliar e analisar comparativamente as lesões linguais identificáveis microscopicamente na carcinogênese experimental nos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}.

4.0. Avaliar e analisar comparativamente a presença de células tumorais circulantes no sangue periférico por meio de citometria de fluxo na carcinogênese experimental nos animais *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}.

5.0. Avaliar e analisar comparativamente a expressão gênica relativa de *NOS2* pela técnica da *qPCR* em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasias bucais e carcinoma de células escamosas bucal.

6.0. Avaliar e analisar comparativamente a imuno-marcação pela técnica de imuno-histoquímica da proteína iNOS e da modificação pós-traducional nitrotirosina, em amostras de tecido humano de mucosa normal, leucoplasias bucais e carcinoma de células escamosas bucal.

7.0. Analisar a imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina a fim de identificar possível correlação entre estas duas proteínas nas lesões de leucoplasia bucal e carcinomas de células escamosas bucal estudadas.

8.0 Analisar a sobrevida global para os pacientes com carcinoma de células escamosas e sua relação com imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina.

9.0. Investigar a existência de relação entre a expressão da proteína iNOS e da modificação pós-traducional nitrotirosina, e os fatores clinicopatológicos relativos aos casos de leucoplasias bucais e carcinoma de células escamosas bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Consideração éticas

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (número de protocolo 019/11 - ANEXO A). Para utilização das amostras teciduais humanas, este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia (CAAE: 00593312.1.0000.5152), segundo o parecer de número 5715 (ANEXO B).

3.2. Carcinogênese bucal experimental

3.2.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos machos das linhagens C57Bl/6 *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} no experimento. Ao todo, 172 camundongos, sendo 77 C57Bl/6 *iNOS*^{+/+} e 95 C57Bl/6 *iNOS*^{-/-} tratados com o 4NQO por 16 semanas foram inicialmente empregados no experimento. Além destes, 30 controles negativos (camundongos não tratados com 4NQO, mas apenas com o propilenoglicol, o veículo diluente do carcinógeno), sendo 15 não tratados (*nt*)-*iNOS*^{+/+} e 15 *nt*-*iNOS*^{-/-} foram também utilizados. Todos os camundongos tinham entre 6 a 8 semanas de idade e peso entre 20 à 25g. Em seguida, camundongos dos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} bem como dos grupos *nt*-*iNOS*^{+/+} e *nt*-*iNOS*^{-/-} foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tempo de sacrifício, como segue: semana 16 (eutanásia imediatamente após o término do tratamento com o 4-NQO (*iNOS*^{+/+}: n=25; *iNOS*^{-/-}: n= 25; *nt*-*iNOS*^{+/+}: n= 5; *nt*-*iNOS*^{-/-}: n=5), semana 24 (*iNOS*^{+/+}: n=26; *iNOS*^{-/-}: n=30; *nt*-*iNOS*^{+/+}: n= 5; *nt*-*iNOS*^{-/-}: n=5) e semana 32 (*iNOS*^{+/+}: n=26; *iNOS*^{-/-}: n=40; *nt*-*iNOS*^{+/+}: n= 5; *nt*-*iNOS*^{-/-}: n=5). Todos os camundongos foram colocados em gaiolas isoladoras forradas com serragem e mantidos em temperatura de 22°C, ciclo claro/escuro de 12/12h e alimentados com ração específica *ad libitum*. O número de animais por grupo (25 camundongos) foi escolhido baseado no teste ANOVA, considerando um poder estatístico de 80% e 5% de nível de significância.

3.2.2. Protocolo de Preparação do 4NQO e Tratamento

O protocolo de preparação do carcinógeno 4NQO seguiu os critérios estabelecidos por Tang *et al.*, 2004. Em resumo, o 4NQO foi diluído em propilenoglicol a 5mg/mL e depois em água

filtrada até atingir a concentração final de 50ug/mL. A solução final foi preparada semanalmente e ofertada aos camundongos por até 16 semanas *ad libitum*. Após o término do tratamento, os camundongos fizeram a ingestão de apenas água filtrada até o período do sacrifício, o qual obedeceu aos seguintes tempos: semana 16 (16ª semana do experimento), semana 24 (24ª semana do experimento) e semana 32 (32ª semana do experimento). Os casos de morte antes do término do tratamento, foram anotados para comparações posteriores entre os grupos.

3.2.3. Exame macro e microscópico das Línguas

Todos os camundongos foram eutanasiados com injeção intraperitoneal contendo Quetamina na concentração de 80mg/Kg (Sintec Brasil LTDA, Cotia-SP, Brasil) e Xilasina, na concentração de 10mg/Kg (Shcering-Plough Coopers, Cotia-SP, Brasil), conforme Wilkey *et al.* (2009). Após esse período, as línguas foram analisadas macroscopicamente para determinação do número de lesões presentes na superfície lingual, utilizando-se para tal procedimento uma lupa estereoscópica em aumento de 2x. Para determinação da incidência de lesões em língua/camundongo, foram computadas e mapeadas apenas aquelas lesões que apresentarem diâmetro $\geq 1,0$ mm. Para determinação da severidade das lesões, um sistema de gradação será utilizado para cada lesão presente na superfície lingual, baseado no aspecto microscópico, conforme descrito por Tang *et al.*, 2004 e Hawkins *et al.*, 1994, como segue: 1 (lesão leve, $>1,0$ e ≤ 1.5 mm), 2 (lesão moderada, $>1,5$ e $\leq 2,0$ mm) e 3 (lesão grave $\geq 2,0$ mm de diâmetro).

Na sequência, uma média foi estabelecida para cada grupo/semana para determinar o grau de severidade entre os grupos. Em seguida, a língua de cada camundongo foi seccionada longitudinalmente, sendo uma metade encaminhada para fixação em formalina tamponada a 4% por 24 h para processamento e inclusão em parafina para análise microscópica das lesões e ensaio imuno-histoquímico, enquanto que a outra metade foi armazenada a -80°C .

Após processamento histológico de rotina, a análise microscópica foi feita em secções de 5µm coradas por H&E para detecção e classificação de displasia e carcinomas. As displasias foram classificadas de acordo com os critérios estabelecidos por KUJAN *et al.*, 2006. Para a classificação dos carcinomas foram usados os critérios atuais estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde em 2005 (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005).

Quadro 1: Critérios morfocitológicos para gradação de displasia epitelial.

Alterações de Arquitetura	Alterações Citológicas
Perda de Polaridade da camada basal	Alteração do tamanho nuclear e celular
Projeções epiteliais em forma de gota	Pleomorfismo nuclear e celular
Aumento do número de mitoses	Aumento da proporção núcleo / citoplasma
Mitoses superficiais anormais	Núcleos aumentados de tamanho
Ceratinização celular prematura	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos numerosos e aumentados
	Hipercromatismo

Fonte: Adaptação da Tabela 3.6 encontrada em Barnes *et al.* (2005), intitulada: “Critérios usados para o diagnóstico de displasia”.

Para classificação final de cada camundongo em relação ao tipo de lesão desenvolvida, foi considerada a lesão de maior relevância no processo carcinogênico, presente nas regiões anterior, média e posterior das amostras e categorizado da seguinte forma: 1. sem lesão, 2. com displasia, e 3. com carcinoma. Ademais, critérios histopatológicos com comprovada importância no prognóstico para o CCEB (1-grau de diferenciação, 2-profundidade de invasão, 3-modo de invasão do fronte tumoral) foram anotados e comparados entre os grupos estudados. A profundidade de invasão foi obtida por microscopia óptica em uma ampliação de 40x, utilizando a ferramenta de mensuração de distâncias microscópicas do *software* LAS EZ (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Tal medida se deu excluindo todo tipo de crescimento exofítico, contando a medida perpendicular da linha imaginária delimitada pela região inferior da camada basal do epitélio normal subjacente até a região de invasão tumoral mais profunda. Para determinação do volume tumoral, será utilizada a fórmula $V=4/3\pi r^3$, onde r é a média do raio tumoral obtido a partir da profundidade de invasão previamente mensurados (SERIL *et al.*, 2007).

3.3. Avaliação do potencial metastático por citometria de fluxo

Para determinar o potencial metastático dos tumores desenvolvidos em camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, foi utilizada a citometria de fluxo na tentativa de detectar células epiteliais tumorais circulantes no sangue periférico desses animais. Para tanto, uma amostra 0,5mL de sangue foi removida por punção retro-orbital dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados com 4NQO imediatamente após anestesia dos animais tratados e do grupo controle (desafiados com propilenoglicol) e acompanhados por 32 semanas, utilizando tubo capilar com heparina (Perfecta Lab, São Paulo-SP, Brasil). O sangue coletado foi armazenado inicialmente em tubos tipo Vacutainer (BD BioSciences, Franklin Lakes-NJ, USA), contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). As amostras de sangue foram centrifugadas por cinco minutos com uma velocidade de 3000 RPM. Após isso, as células foram ressuspensas em RPMI mais o mesmo volume de tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA, pH 7,4). As células foram então incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, foram novamente centrifugadas e ressuspensas em RPMI para a obtenção do número total de células utilizando-se a câmara de Neubauer. Dessa forma, a concentração das células foi acertada para aproximadamente, 4 x 10⁶ células/mL em tampão fosfato (PBS), contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de azida sódica.

Em seguida, alíquotas de 500µL de células foram colocadas em tubos *eppendorfs*, fixadas com formalina a 4% por 10 minutos, novamente centrifugadas e posteriormente tratadas com soro de camundongo inativado por 30 minutos a 4°C para inibição de futuras ligações inespecíficas do anticorpo primário. Ao final da incubação, as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. A suspensão de células foi submetida a dupla marcação com o anticorpo anti-citoqueratina 19 (anti-CK19) de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA) e com o anticorpo primário anti-CD45 de camundongo marcado com PerCP-Cy5.5 (*gate* de exclusão), incubados por 60 minutos a 4°C, protegidas da luz. Após esta etapa, as células foram novamente centrifugadas, resuspensas em PBS e transferidas para os tubos apropriados para a leitura no aparelho de Separação de Células Ativadas por Fluorescência, do inglês “*Fluorescence-Activated Cell Sorting*” (FACS). As células foram analisadas por meio de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Company, San Diego, CA), com aquisição de 30.000 eventos utilizando-se uma janela de análise (*gate*), a partir dos parâmetros *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC).

Para a leitura e a análise das amostras foi utilizado o *software* FlowJo, versão 10.7 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Considerando o gate das células de interesse, foram obtidos histogramas de intensidade de fluorescência do respectivo fluorocromo (FITC, e/ou PerCP-Cy5.5) em escala logarítmica fornecida pelo citômetro. Os resultados foram fornecidos na forma de porcentagem e número absoluto de leucócitos positivos e, de forma quantitativa, foram representados pela intensidade média de fluorescência - razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) da amostra em estudo e do respectivo controle negativo. Para esta avaliação, foram consideradas células tumorais circundantes todos os eventos CD45⁺/CK-19⁺.

3.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

3.4.1. Amostras de tecido humano

O grupo controle constituiu-se de mucosas de bochecha doadas espontaneamente por indivíduos saudáveis e de mucosas adjacentes a mucocelos tratadas por exérese na Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Faculdade de Odontologia da UFU (n=5). As amostras do grupo leucoplasia (Código Internacional das Doenças (CID):K13.2) foram coletadas prospectivamente de 19 pacientes atendidos entre 2012 e 2014, provenientes dos ambulatórios: 1- Unidade de Diagnóstico Estomatológico e 2- Cirurgia Bucomaxilofacial, ambos pertencentes a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU). Amostras de pacientes com CCEB foram obtidas durante exérese do tumor (CID: C00 a C06 e C09 e C10), no Hospital de Clínicas da UFU no período entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014 foram usadas no estudo (n = 9, sendo cinco casos metastático e quatro casos não-metastático). Todos os casos foram coletados e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido até sua utilização nos ensaios subsequentes.

Todos os pacientes avaliados no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Além disso, todos os casos selecionados tiveram suas lâminas recuperadas para confirmação do diagnóstico de LB e de CCEB, de acordo com os critérios estabelecidos por KUJAN *et al.*, 2005 e pela Organização Mundial de Saúde (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005), respectivamente.

3.4.2. Dados sociodemográficos e clinicopatológicas

Informações sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes participantes foram obtidas a partir de consulta aos prontuários médicos. Todos os dados foram coletados por meio de um instrumento de coleta qualificado (questionário semiestruturado). Informações relativas às características sociodemográficas dos pacientes foram levantadas da seguinte forma: idade (≤ 60 anos e > 60 anos), sexo (masculino e feminino), cor (branca e não-branca), comportamentos relacionados à doença (tabagismo e etilismo). Características clinicopatológicas como: sintomatologia (presente ou ausente), tempo de evolução (< 6 meses ou ≥ 6 meses), localização (considerada como o epicentro da lesão), tamanho (≤ 4 cm e > 4 cm) e gradação histológica foram obtidas dos prontuários. Por sua vez, a gradação da displasia no grupo de leucoplasia foi realizada seguindo-se os critérios de Kujan *et al.*, 2006, segregando-as em: 1- Displasias epiteliais de alto risco de malignização (DAR): observação de, no mínimo, quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas, e 2- Displasias epiteliais de baixo risco de malignização (DBR): associada à observação de menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas. Para a gradação histológica dos tumores, empregou-se os critérios estabelecidos pela OMS (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005), como segue: 1- bem diferenciado, 2- moderadamente diferenciado e 3- pobremente diferenciado.

Ademais, foram levantadas de forma detalhada os seguintes dados apenas para os casos de CCEB: estadiamento (lesão inicial ou avançada), tratamento, presença de metástase loco-regional, recidiva e condição clínica (vivo sem doença, vivo com doença e óbito). Para o estadiamento dos pacientes com CCEB, utilizou-se o sistema estabelecido pela *International Union Against Cancer* (UICC)/*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN *et al.*, 2009). A presença de metástase locorregional foi inicialmente estabelecida por exames de imagem (Tomografia Computadorizada) e depois confirmada por exame histopatológico dos linfonodos coletados durante o esvaziamento cervical do paciente, no transcurso da cirurgia. A confirmação de metástase foi usada para categorizar os pacientes com CCEB em dois grupos: aqueles com tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM) para fins comparativos quanto à expressão dos genes investigados. Todos os casos incluídos no estudo tiveram dados de acompanhamento mínimo de 12 meses. Todos os componentes dos grupos controles eram não tabagistas, com idades variando entre 20 a 40 anos.

3.4.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os iniciadores ou *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta de “*design de primers*” da empresa Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA), através do link *PrimerQuest® Tool* (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Os parâmetros escolhidos foram definidos para a *qPCR Intercalating Dyes*, considerando os seguintes fatores: temperatura de *melting* de 60°C, porcentagem de bases GC de 50%, tamanho do primer de 18-22pb, tamanho do *amplicon* de 80 a 150pb e energia livre de Gibbs (ΔG) baixa (Thornton & Basu, 2011). As sequências dos genes alvos foram obtidas pelo site da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/>). Em seguida, para seleção do melhor primer/gene, utilizou-se o site da IDT® e, finalmente o programa *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tal que *primers* de menor *expect-value* (*e-value*) foram finalmente selecionados (Thornton & Basu, 2011). A Tabela 4 detalha os *primers forward* e *reverse* empregados no estudo, de acordo com os parâmetros acima mencionados.

Quadro 2: Sequência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) com suas respectivas referências.

Gene	Sequência dos primers	Referência NCBI
NOS2	R: 5'- GCGTTACTCCACCAACAATGGCAA-3'	NM_000625.4
	F: 5'-ATAGAGGATGAGCTGAGCATTCCA-3'	NM_000625.4
B2M F	R: 5'- TATCCAGCGTACTCCAAAGA-3'	NM_004048.2
	F: 5'- GGATGAAACCCAGACACATAG-3'	NM_004048.2

Fonte: dados da pesquisa

3.4.4. Extração de RNA

As extrações de RNAs de todas as amostras congeladas (mucosa normal e LB) foram realizadas no equipamento Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) empregando-se o *kit* de extrações de RNA Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como todas as soluções utilizadas disponíveis no *kit*. Previamente, foi realizada a macrodissecção de todas as amostras com o auxílio de lupa estereoscópica para remoção do tecido conjuntivo. Após a pesagem (máximo de 0,05g), cada amostra foi macerada em ambiente refrigerado (cuba com gelo) em meio contendo 200 µL da solução de trabalho (1 mL de solução de homogeneização para

cada 20 µL de 1-tioglicerol) com auxílio do homogeneizador de tecido Pellet Pestles® (Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Sao Paulo, Brazil). Seguida a aplicação de 200µL de tampão de lise, as amostras foram agitadas em vortex por 15 segundos, centrifugadas a 1000g por 2 min. a 4°C e os sobrenadantes coletados (400 µL) e colocados nos cartuchos (*cartridges*, que são suportes disponíveis no *kit*), posteriormente foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) para extração dos RNAs. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000 (Thermo-Fisher, Wilmington, DE, USA), utilizando a relação 260/280 (índice de absorbância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorbância variando de 1,9 a 2,4). Todos os RNAs extraídos foram armazenados em freezer -80°C até a realização dos procedimentos de transcrição reversa.

3.4.5. Transcrição reversa

Utilizou-se o *kit* GoScript™ Reverse Transcription System (A5001, Promega, Madison, WI, USA) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7 µL de Primer Mix (1µL de Oligo DT, 1 µL de Random Primer e 5µL de RNA total foi incubado a 70°C por 5 min.) e 13µL de RT Mix (5 µL de água livre de RNase, 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de dNTP Mix, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de RNasin e 1 µL de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 10 min. a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA/amostra foi alíquotado e armazenado em freezer -20°C até a utilização nos ensaios da qPCR.

3.4.6. qPCR

A quantificação da expressão dos genes *NOS2* e *B2MF* foram realizados no aparelho StepOnePlus™ *Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) por meio do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Todos os experimentos realizados foram montados em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical, 0,1mL (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para montagem dessas placas de 96 poços, empregou-se o programa *StepOne Software* versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos., e

60°C por 1 min. Para determinação da curva de *melting*, empregaram-se ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min. e 95°C por 15 seg. A reação teve um tempo total de aproximadamente 2 horas.

Para a reação, utilizou-se o GoTaq® qPCR Master Mix (A6001, Promega, Madison, WI, USA), que contém sondas com propriedades espectrais semelhante ao SYBR® Green I, com excitação a 493 nm e emissão a 530 nm. As proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 6µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 0,5 µL de *primer forward*, 0,5 µL de *primer reverse* e 3,1 µL de água livre de RNase, totalizando 10,0 µL de mix em cada poço. A quantidade de cDNA utilizada foi de 2,0 µL (10ng de cDNA), totalizando em cada poço 12 µL de solução.

A expressão relativa de cada gene foi estabelecida pela normalização da *qPCR* em relação ao gene controle β 2-microglobulina (*B2M*) (Tabela 4). O modelo matemático adotado para a avaliação da expressão relativa (*r*) entre o gene alvo e o gene controle foi através da diferença entre os valores de Ct do gene controle e dos valores de Ct do gene alvo ($\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene controle}$), considerando o cálculo de eficiência das reações de ambas *qPCR* (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008). A partir dos valores de ΔCt dos grupos LAR e LBR, foi possível ainda subtrair a variação de ΔCt das amostras controles através da média do ΔCt (calibrador) delas, tal que ao final foi obtido o $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct - \text{calibrador}$. Para as análises dos resultados finais foram considerados a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta \Delta Ct}$ considerando as médias das duplicatas (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009).

3.5. Imuno-histoquímica

3.5.1. Amostras de tecido humano

O grupo controle utilizado para a análise imuno-histoquímica (*n* = 16) constituiu-se de fragmentos de tecidos epiteliais de mucosas histologicamente normais advindos de material excedente de exames histopatológicos encaminhados ao Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. O grupo de leucoplasias estudadas (CID:K13.2) foi composto por 42 amostras diagnosticados em 39 pacientes provenientes do atendimento realizado no ambulatório da Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU) entre os anos de 1994 e 2011. Para o grupo de CCEB, foram utilizadas 85 amostras teciduais fixadas em formalina (solução de

formol a 10%), coletadas retrospectivamente (CID: C00 a C06 e C09 e C10) a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2013.

Todos os pacientes empregados no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C). Além disso, todos os casos selecionados tiveram suas lâminas recuperadas para confirmação do diagnóstico de LB e de CCEB de acordo com os critérios estabelecidos por Kujan *et al.*, 2005 e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (GALE, *et al.*, 2005; EL NAGGAR & REICHART, *et al.*, 2005), respectivamente.

3.5.2. Dados sociodemográficos e clinicopatológicos

Informações sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes participantes foram obtidas a partir de consulta aos prontuários médicos. Todos os dados foram coletados através do uso de um instrumento de coleta qualificado (questionário semiestruturado). Informações relativas às características sociodemográficas dos pacientes foram levantadas da seguinte forma: idade (≤ 60 anos e > 60 anos), sexo (masculino e feminino), cor (branca e não-branca), comportamentos relacionados à doença (tabagismo e etilismo). Características clinicopatológicas como: sintomatologia (presente ou ausente), tempo de evolução (< 3 meses, $\geq 3 < 6$ meses ou ≥ 6 meses), localização (considerada como o epicentro da lesão), tamanho (≤ 4 cm e > 4 cm) e gradação histológica foram obtidas dos prontuários. Por sua vez, a gradação da displasia no grupo de leucoplasia foi realizada seguindo-se os critérios de Kujan *et al.* (2006), segregando-as em: 1- Displasias de alto risco de malignização (DAR): observação de, no mínimo, quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas, e 2- Displasias de baixo risco de malignização (DBR): associada à observação de menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas. Para a gradação histológica dos tumores, empregou-se os critérios estabelecidos pela OMS (JOHNSON *et al.*, 2005; SLOOTWEG & EVESON, 2005), como segue: 1- bem diferenciado, 2- moderadamente diferenciado e 3- pobremente diferenciado.

Ademais, foram levantadas de forma detalhada os seguintes dados apenas para os casos de CCEB: estadiamento (lesão inicial ou avançada), tratamento, presença de metástase loco-regional, recidiva e condição clínica (vivo sem doença, vivo com doença e óbito). Para o estadiamento dos pacientes com CCEB, utilizou-se o sistema estabelecido pela *International Union Against Cancer*

(UICC)/*American Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN *et al.*, 2009). A presença de metástase locorregional foi inicialmente estabelecida por exames de imagem (Tomografia Computadorizada) e depois confirmada por exame histopatológico dos linfonodos coletados durante o esvaziamento cervical do paciente no transcurso da cirurgia. A confirmação de metástase foi usada para categorizar os pacientes com CCEB em dois grupos: aqueles com tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM) para fins comparativos quanto à expressão dos genes investigados. Todos os casos incluídos no estudo tiveram dados de acompanhamento mínimo de 12 meses. Todos os componentes dos grupos controles eram não tabagistas, com idades variando entre 20 a 40 anos.

3.5.3. Confecção da matriz de amostras teciduais para os casos de CCEB.

Os 85 casos de CCEB foram organizados em uma matriz de amostras teciduais (Kononen *et al.* 1998) conhecida como TMA (do inglês, *Tissue Macro Array*). Essa técnica consiste na incorporação de amostras de tecidos diferentes em um bloco de parafina de tamanho convencional (bloco de tecido “multitumor”), o que permite o estudo e análise de expressão de marcadores moleculares em larga escala, com grande aproveitamento de material arquivado, redução de tempo e custo, com o uso de pequena quantidade de tumor, e uniformização das reações e facilidade na análise comparativa dos casos (ANDRADE *et al.*, 2007).

Para cada bloco recuperado, foram selecionadas duas áreas tumorais (duplicata) situadas lateralmente, sempre respeitando os limites das células tumorais. Para definir-se essas áreas, selecionou-se a lâmina que continha a maior quantidade de tumor para evitar erro amostral no TMA, e nessa lâmina a área escolhida era selecionada. Para selecionar as duas áreas na lâmina, utilizou-se um microscópio de campo claro (Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão) no aumento de 10x. As duas regiões selecionadas foram então marcadas na lâmina com uma caneta de retroprojeto e, depois, transferidas no respectivo bloco por sobreposição.

Para confecção do TMA, utilizou-se o *core facilit* do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). Assim, a partir do bloco doador, uma agulha de captura de 1 mm de diâmetro foi introduzida no bloco doador e, em seguida, transferido para o bloco receptor obedecendo um padrão de matriz espaçado de precisão com núcleos de um milímetro de diâmetro. Por fim, o bloco receptor foi cortado, sendo duas delas

(inicial e final) coradas em H&E, e as demais para ensaio imuno-histoquímico. A localização de cada amostra tumoral no TMA em duplicata foi devidamente identificada no mapa do TMA.

3.5.4. Ensaios imuno-histoquímicos.

A técnica utilizada para identificação da expressão da proteína iNOS e da modificação pós-traducional nitrotirosina foi a da estreptavidina-biotina-peroxidase. Aspectos relativos as diluições consideradas para cada anticorpo, os controles positivos empregados, e as respectivas referências de catálogo estão detalhados na Tabela 2.

Quadro 3: Anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos, com os respectivos clones, origem, código do anticorpo, fabricante, diluições de uso e os respectivos controles positivos empregados.

Anticorpo	Clone	Origem	Código	Fonte	Diluição	Controle +
NOS2	N-20	Policlonal/Coelho	sc-651	Santa Cruz	1:75	Ca de Colon
Nitrotirosina	39B6	Monoclonal/Camundongo	sc-32757	Santa Cruz	1:75	Ca de Colon

+: positivo. Fonte: dados da pesquisa

Para o ensaio imuno-histoquímico, cortes teciduais de 3µm de espessura, provenientes de tecido fixado em formol e incluídos em parafina foram obtidos e montados em lâminas polarizadas StarFrost® (Knittel Glaser, Brunsvique, BS, Alemanha). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100% a 70%). Para a remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, por 10 min., e, em seguida, lavados por sete passagens em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada de acordo com padronizações desenvolvidas no Laboratório, utilizando-se solução tampão EDTA, 1M (pH 8.0) em Decloaking Chamber™ NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA) com ciclo de 110°C por 15 min.. Após o resfriamento e lavagem em cinco banhos de água destilada, os cortes foram submetidos primeiramente, ao bloqueio da biotina endógena com solução de clara de ovo, na proporção de duas claras de ovo para 200 mL de água destilada. Essa solução é previamente homogeneizada e filtrada e então incubada com as lâminas a 37°C, por 30 min., seguida de lavagens por 10 passagens em água destilada, para retirar todo o excesso da solução.

Na sequência, deu-se o bloqueio da avidina endógena utilizando-se leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), na proporção de 30g de Molico® para 180 mL de água destilada, a 37°C por 20 min., o que foi seguido de 10 banhos em água destilada (MILLER *et al.*, 1999). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de H₂O₂ (5V) + Metanol em água destilada, em três banhos de 15 min., cada.

Após esse bloqueio, os cortes foram lavados em cinco banhos de água destilada e, em seguida, a três banhos de cinco min. cada, em solução tampão TRIS-HCl 0,5M (pH 7.4). Depois desses passos, os cortes foram submetidos a incubações com o *kit* Starr Trek™ Universal HRP Detection System (STUHRP700, Biocare Medical, Concord, CA, USA). Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a 37°C: a primeira solução utilizada foi a solução de bloqueio Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA), por 15 min. para bloqueio de ligações inespecíficas; a após a retirada do excesso de líquido sobre as lâminas com auxílio de papel filtro, deu-se a incubação com os anticorpos primários, por 2 horas. Os cortes foram então lavados em solução de TRIS-HCl, em dois banhos de 2 min. cada, e incubados com a solução Trekkie Universal Link (disponível no *kit* Starr-Trek™) contendo anticorpo secundário, a 37°C por 20 min.. Os cortes foram novamente lavados em TRIS-HCl, em dois banhos de 2 min. cada, e imersos com a solução contendo o complexo terciário TrekAvidin-HRP (disponível no *kit* Starr-Trek™), a 37°C por 10 min., seguido de lavagem em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 min. cada novamente.

A revelação foi realizada com cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (disponível no *kit* Starr-Trek™) por 3 min., após esse passo os cortes foram lavados em água corrente e depois contracolorados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% a 100%), diafanizados em xilol e finalmente montados. Os controles positivos estão especificados na Tabela 2 e a omissão dos anticorpos primários foi utilizada como controle negativo.

3.5.5. Avaliação da imuno-histoquímica

Para este procedimento foi empregado o método de avaliação semiquantitativa *Quickscore* (DETRE, SCLANI, DOWSETT, 1995). Esta avaliação leva em consideração dois parâmetros, a saber: intensidade de marcação (I) e a proporção de células marcadas (P), as quais foram consideradas na avaliação de cada lâmina, para cada proteína avaliada. Para tanto, foram avaliados 10 campos aleatórios em cada lâmina, com sequência padronizada, ampliados a 400X

(aumento original). Ao final, o índice *Quickscore* (Q) foi obtido por cada expressão avaliada por lâmina a partir da fórmula $Q = P \times I$. A distribuição dos valores relativos a intensidade (I) e percentual (P) de marcação utilizados no método está detalhada na Tabela 3. Todas as análises que empregaram estes índices foram efetuadas a partir de valores de mediana para Q (MQ) por caso, por produto gênico avaliado.

Quadro 4: Distribuição dos *scores* conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas.

Variáveis	Classificação					
Score	1	2	3	4	5	6
Porcentagem (P)	0-4%	5-19%	20-39%	40-59%	60-79%	80-100%
Score	0	1	2	3		
Intensidade (I)	Negativo	Fraco	Moderado	Forte		

Fonte: Detre, Sclani e Dowsett (1995).

3.6. Análise estatística

Os dados experimentais descritos utilizando, quando pertinente, média \pm desvio padrão, mediana e percentual. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todos os grupos, a distribuição das amostras foi caracterizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson. Em todas as análises, utilizou-se o intervalo de confiança de 95%; foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

Em relação a análise realizada para os grupos *iNOS*^{+/+}; *iNOS*^{-/-}; *nt-iNOS*^{+/+} e *nt-iNOS*^{-/-}, as seguintes análises foram desenvolvidas:

1. As comparações entre o consumo hídrico, entre o peso ponderal e peso hepático foram realizadas utilizando teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn;
2. Para análise de sobrevivência, empregou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste log-rank de Mantel-Cox para estimar as diferenças entre os grupos;
3. Para comparar a multiplicidade e a severidade das lesões obtidas pela análise macroscópica utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn;

4. A taxa de incidência de displasia e carcinoma por grupo/tempo de sacrifício foi analisada pelo teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher e pelo Teste Z;
5. Para análise da interrelação entre o tempo de acompanhamento e a presença e ausência de *iNOS* no desenvolvimento de displasias e carcinomas foi usado o Teste ANOVA bi-caudal;
6. A multiplicidade tumoral e as médias obtidas no volume tumoral foram analisada pelo teste *U* de Mann-Whitney;
7. Para análise da presença de células tumorais circulantes nos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, utilizou-se o Teste Exato de Fisher e o Teste Z.

Em relação a análise realizada para os grupos CTR, LB e CCEB humanos, as seguintes análises foram desenvolvidas:

1. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos controle, LB e CCEB foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn;
2. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos controle, DAR e DBR bucal foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn;
3. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos CCEB metastático e não-metastático foi utilizado o teste *U* de Mann-Whitney;
4. O teste de correlação de Spearman foi utilizado nas análises de correlação entre as imuno-marcações de *iNOS* e Nitrotirosina.
5. Para análise de sobrevida, empregou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste log-rank de Mantel-Cox para estimar as diferenças entre elas.
6. Para verificar associação entre as imuno-marcações e as diferentes variáveis clinicopatológicas estudadas, foram efetuados o teste Exato de Fisher e/ou teste do Qui-

quadrado. Para a realização dos testes citados, as variáveis do grupo LB foram categorizadas como segue:

- a. Idade: não idosos quando a idade era menor que 60 anos; idosos, com idade igual ou maior que 60 anos;
- b. Sexo: masculino e feminino;
- c. Etilismo: sim/não;
- d. Tabagismo: sim/não;
- e. História pessoal de câncer: sim/não;
- f. Sintomatologia: sim/não;
- g. Tamanho: $\leq 200\text{mm}^2$ / $> 200\text{mm}^2$;
- h. Tipo de LB: homogênea / não homogênea;
- i. Presença de displasia: Lesão de alto risco (DAR) / lesão de baixo risco (DBR);
- j. Transformação Maligna: sim/não.

Para as análises, os casos de CCEB foram separados em grupos da seguinte forma:

- a. Grupo Primário Não Metastático (CCEB-NM); 3) Grupo Primário Metastático (CCEB-M);
- b. Idade: ≤ 60 anos; > 60 anos;
- a. Sexo: masculino e feminino;
- b. Etilismo: sim/não;
- c. Tabagismo: sim/não;
- d. História familiar de câncer: sim/não;
- e. Localização das lesões: Língua, Assoalho Bucal e Outros;
- f. Sintomatologia: sim/não;
- g. Dimensão da lesão: ≤ 4 cm; > 4 cm (baseado no sistema de estadiamento clínico; TNM onde lesões iniciais T1 e T2 possuem até 4 cm;
- h. Estágio da doença: estágio inicial (pacientes diagnosticados nos estágios I e II) e estágio avançado (pacientes diagnosticados nos estágios III e IV); Metástases: metastático e não metastático.

4.0. RESULTADOS

4.1. Descrição de fatores relacionados à carcinogênese bucal experimental em camundongos desafiados com 4NQO

4.1.1. Volume hídrico consumido semanalmente

A Figura 1 demonstra o consumo hídrico nas 16 semanas iniciais da carcinogênese para os grupos estudados. Nota-se que os animais dos grupos controles apresentaram consumo hídrico estatisticamente superior, quando comparados aos dos grupos experimentais. O grupo controle *iNOS*^{+/+} demonstrou a maior mediana de consumo (210 mL/semana), superior à todos os outros grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de consumo dos grupos experimentais *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}.

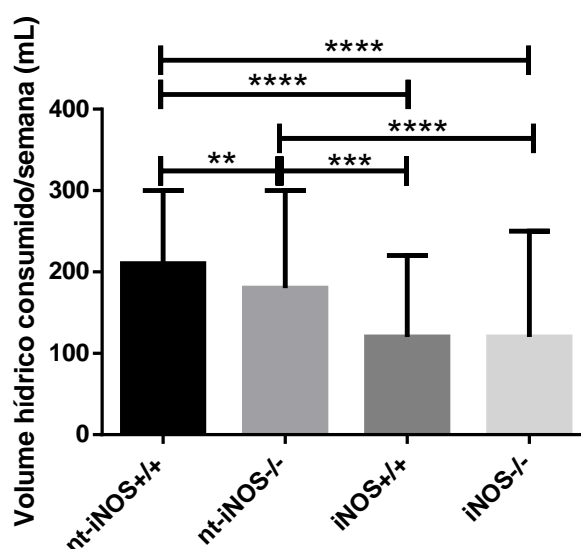


Figura 1: Consumo hídrico sem e com carcinógeno diluído dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados e não tratados (nt), nas 16 semanas iniciais do acompanhamento, apresentados com mediana e intervalo. Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$).

Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.1.2. Peso corporal total e hepático no momento do sacrifício

A análise ponderal corporal e hepática no momento do sacrifício revelou que o tratamento com 4NQO provocou diminuição de peso em camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}. Observou-se

também que a redução em ambos os pesos para o grupo *iNOS*^{-/-} foi significativamente superior em relação aos demais grupos (Figura 2 e Figura 3).

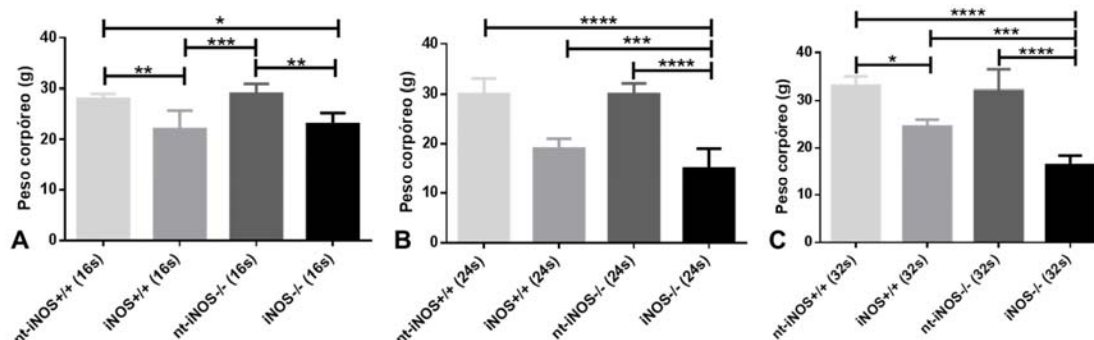


Figura 2: Avaliação ponderal dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados e não tratados (nt), no momento do sacrifício, apresentada com mediana e intervalo. (A) 16 semanas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (B) 24 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (C) 32 semanas. Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

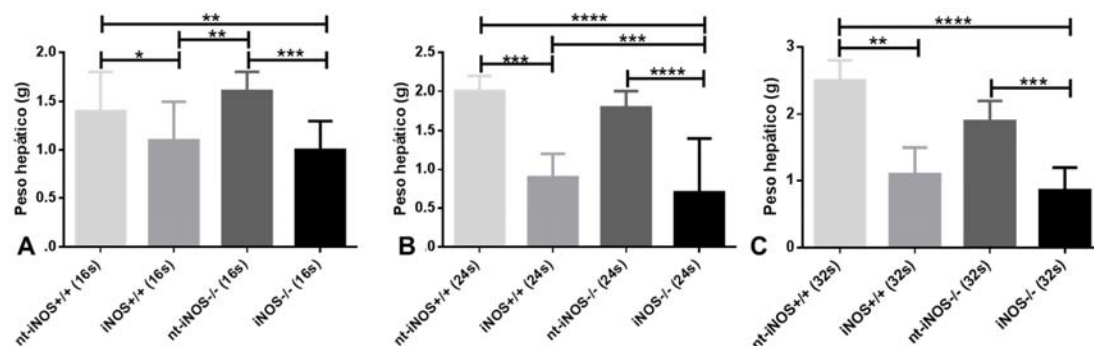


Figura 3: Análise ponderal dos fígados dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados e não tratados (nt), no momento do sacrifício, apresentados com mediana e intervalo. (A) 16 semanas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (B) 24 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$); (C) 32 semanas (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p < 0,0001$). Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas. Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.1.3. Mortalidade e sobrevida global

O tratamento com 4NQO produziu morte em 18% dos animais ao fim das 32 semanas de tratamento. Não houve morte registrada para nenhum animal dos grupos controles e nem para camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} no período experimental de 16 semanas. Para os grupos experimentais de 24 semanas, foram registradas seis mortes, sendo cinco para os animais *iNOS*^{-/-} e uma para os animais *iNOS*^{+/+}. Esta diferença não foi estatisticamente significativa. No grupo de 32 semanas de acompanhamento, foram identificadas 25 mortes: 24 no grupo *iNOS*^{-/-} e uma no grupo *iNOS*^{+/+}, diferença que foi estatisticamente significativa (Figura 4).

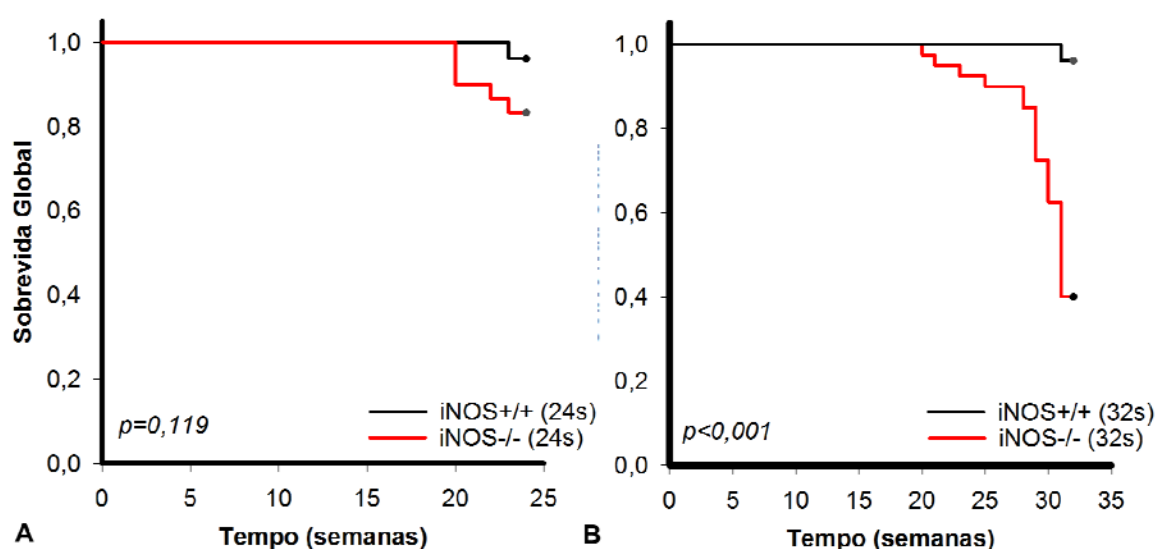


Figura 4: Curvas de sobrevida global (Kaplan-Meier) para os grupos de camundongos tratados com 4NQO (*iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}), segregados de acordo com os períodos experimentais. (A) 24 semanas de acompanhamento (Teste Log-Rank, $p=0,119$); (B) 32 semanas de acompanhamento (Teste Log-Rank, $p<0,001$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.2. Análise macroscópica das lesões em superfície lingual dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO

A avaliação macroscópica evidenciou um aumento do número de lesões e na severidade destas de acordo com o tempo de acompanhamento, para ambos os grupos selvagem e *knockout* para *iNOS* (Tabela 1). Ambos os grupos de camundongos apresentaram um número de lesões semelhantes quando comparados, respeitando os períodos experimentais. Devemos ressaltar, que

muitas vezes as alterações no dorso da língua dos animais de ambos os grupos se tornavam coalescentes ocupando toda a superfície epitelial, principalmente nos grupos com 32 semanas de acompanhamento.

A Figura 5 demonstra as medianas e a variação do número e da severidade das lesões observadas nos animais tratados segundo os períodos de observação. Podemos observar diferenças estatisticamente significantes nas comparações das análises macroscópicas do número de lesão e da severidade macroscópica destas. Para cada grupo analisado, percebe-se um aumento do número e da severidade das lesões, aparente nos períodos do experimento. Tais diferenças são apenas estatisticamente importantes quando os grupos com diferentes tempos de acompanhamento foram comparados. Não se observou diferenças estatísticas significativas entre os grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} nos mesmos tempos de acompanhamento.

Tabela 1: Distribuição das lesões linguais nos camundongos tratados por 4NQO, identificadas por análise macroscópica, em função do número e severidade, expressos por mediana e variação, entre parênteses.

Grupos	<i>iNOS</i>^{+/+} 16s (n=25)	<i>iNOS</i>^{+/+} 24s (n=25)	<i>iNOS</i>^{+/+} 32s (n=25)
Multiplicidade	2 (1-3)	2 (1-5)	3 (2-6)
Severidade	1 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-3)
Grupos	<i>iNOS</i>^{-/-} 16s (n=25)	<i>iNOS</i>^{-/-} 24s (n=25)	<i>iNOS</i>^{-/-} 32s (n=16)
Multiplicidade	2 (1-3)	2 (1-4)	3 (1-4)
Severidade	1 (1-2)	1 (1-3)	2 (1-3)

Fonte: dados da pesquisa.

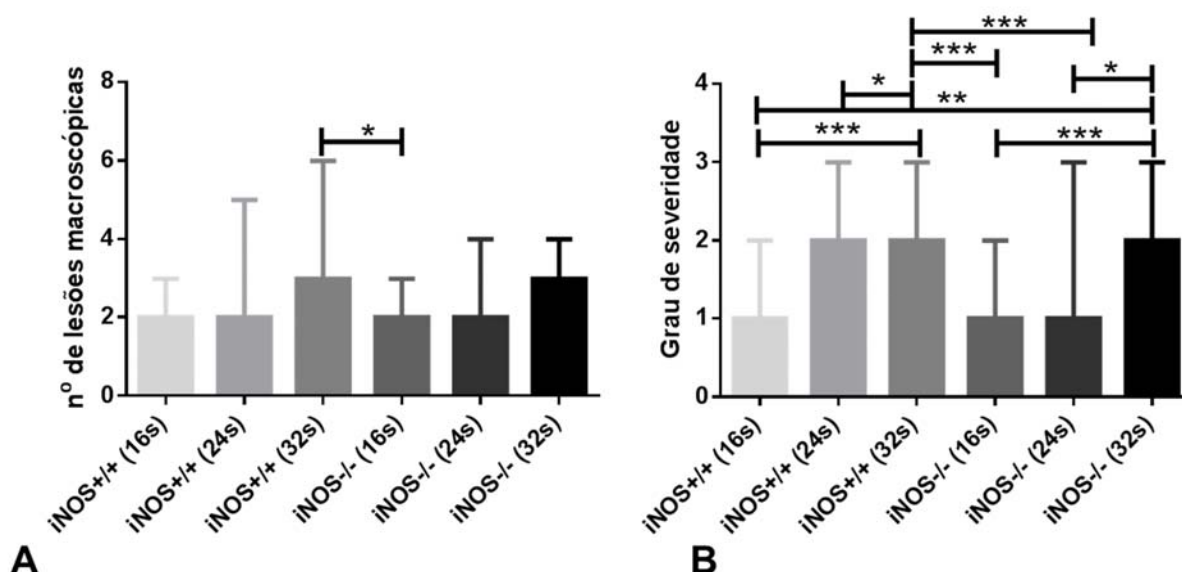


Figura 5: Análise macroscópica das línguas dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO, em função dos tempos experimentais. (A) Número de lesões (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p=0,0090$); (B) Severidade das lesões (tamanho). Os asteriscos identificam as comparações que demonstraram diferenças significativas (teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn; $p<0,0001$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.3. Análise microscópica das línguas dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados pelo 4NQO

A Figura 6 demonstra as características histológicas representativas das alterações diagnosticadas nos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}; A Tabela 2, demonstra a incidência das lesões mais graves identificadas nas línguas dos camundongos tratados, segregadas pela localização e pelos tempos experimentais determinados. Os animais não tratados, não desenvolveram nenhuma lesão em nenhum dos tempos avaliados. A Tabela 3, demonstra a mediana e o intervalo de distribuição de todas as lesões diagnosticadas nos grupos estudados.

4.3.1. Hiperplasias

Em ambos os grupos, pode-se observar um pequeno número de alterações hiperplásicas no epitélio lingual dos animais tratados, sendo mais incidentes na região lingual anterior, nos grupos da 16ª e 24ª semanas de acompanhamento. Em números absolutos, as lesões hiperplásicas foram

mais comuns no grupo *iNOS*^{-/-} que no grupo *iNOS*^{+/+}. Ao se comparar estas lesões sem segregá-las de acordo com suas localizações, o grupo *iNOS*^{-/-} apresentou as maiores incidências de hiperplasia na 16ª semana, quando comparadas com os animais *iNOS*^{+/+} no mesmo período, diferença estatisticamente significativa (Teste Qui-quadrado, $p=0,001$). Ao se segregar as lesões hiperplásicas por localização, notou-se associação estatisticamente significativa apenas entre a presença de hiperplasia na região anterior e o grupo *iNOS*^{-/-} (Teste de Fisher, $p=0,006$). Não existe nenhuma outra associação significativa entre hiperplasias segregando-as ou não pelas diferentes localizações e os grupos estudados (Teste de Fisher, $p>0,05$).

4.3.2. Displasias

Em todos os períodos experimentais avaliados, alterações histopatológicas displásicas foram encontradas em diferentes regiões de uma mesma língua, caracterizando a carcinogênese como um evento multifocal.

DBR foram observadas em todos os 75 animais (100%) *iNOS*^{+/+}. Sessenta e cinco dos 66 animais *iNOS*^{-/-} (98,5%) apresentaram DBR, não sendo estatisticamente diferente do número apresentado pelos animais *knockout* (teste Z: $p=0,859$; Teste Exato de Fisher: $p=0,949$). Nos dois grupos, a DBR apresentou predileção pela região anterior e foram mais comuns na 16ª semana, decrescendo em frequência nos grupos de 24 semanas, sendo raras no de 32 semanas.

Ao se contabilizar o número total de DBR de maneira absoluta, sem segregá-las de acordo com suas localizações, estas lesões foram mais comuns no grupo *iNOS*^{-/-} que no grupo *iNOS*^{+/+}. O grupo *iNOS*^{-/-} apresentou maiores incidências de DBR apenas na 24ª semana, quando comparados com os animais *iNOS*^{+/+} no mesmo tempo experimental (teste Z: $p=0,021$; Qui-quadrado, $p=0,021$). Não observamos nenhuma outra associação significativa entre as DBR segregando-as ou não pelas diferentes localizações e os grupos estudados (Teste de Fisher, $p>0,05$). Ao se comparar a incidência de DBR entre os grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, segregando-os pelo tempo de sacrifício, podemos observar maior incidência de DBR apenas nos animais *iNOS*^{+/+} na 16ª semana, quando comparados com os animais *iNOS*^{-/-} desta mesma semana (teste U de Mann Whitey, $p=0,0021$). Não existe diferença estatística significativa na incidência de DBR nos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} acompanhados por 24 e 32 semanas (teste U de Mann Whitey, $p>0,05$).

Para DAR, observou-se uma frequência significativamente maior de lesões nos animais *iNOS*^{+/+} (55/75, 73,3%), comparativamente aos animais *iNOS*^{-/-} (36/66, 54,5%) (teste Z: $p=0,032$;

Teste Qui-quadrado: $p=0,032$). Estas lesões foram mais comuns na região média/posterior da língua de camundongos na 24^a e 32^a semana em ambos os grupos, sendo raras nas outras localizações e tempos estudados.

Ao se analisar estas lesões sem segrega-las por localização, o grupo *iNOS*^{+/+} apresentou maiores incidências de DAR apenas na 16^a semana, quando comparados com os animais *iNOS*^{-/-} nas mesmas datas (teste Z: $p=0,038$; Qui-quadrado, $p=0,038$). Não identificamos nenhuma outra associação significativa entre DAR, segregando-as ou não pelas diferentes localizações e os grupos estudados (Teste de Fisher, $p>0,05$). Ao se confrontar a incidência de DAR entre os grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, segregados pelo tempo de sacrifício, podemos observar maior incidência de DAR nos animais *iNOS*^{+/+} na 24^a semana e 32^a semana, quando comparados com os animais *iNOS*^{-/-} com as mesmas datas (teste U de Mann Whitey, $p=0,0035$ e teste U de Mann Whitey, $p=0,0392$, respectivamente). Não existe diferença estatística significativa na incidência de DAR nos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} acompanhados por 16 semanas (teste U de Mann Whitey, $p>0,05$).

4.3.3. Carcinomas

Ao analisar os CCEB, observou-se maior frequência global de lesões nos animais *iNOS*^{+/+} (40/75, 53,3%), comparado aos *knockouts* (22/66, 33,3%). Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa (teste Z: $p=0,026$; Teste Qui-quadrado: $p=0,027$).

Considerando os tempos experimentais, observou-se que a incidência de CCEB em ambos os grupos se concentra nos animais acompanhados até a 24^a e a 32^a semana. As lesões neoplásicas do grupo *iNOS*^{+/+} predominaram para a região posterior; cerca de 55% de todos os carcinomas emergiram nesta área. No grupo *iNOS*^{-/-} as neoplasias incidiram com maior frequência na região média (68,2%). Comparando a incidência de todos os CCEB diagnosticados nos animais *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, apenas a 32^a semana, mostrou diferença significativas entre os grupos (teste t de Student, $p=0,05$). Não existe diferença estatística significativa na incidência de CCEB nos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} acompanhados por 16 e 24 semanas (teste U de Mann Whitey, $p>0,05$). Nota-se presença de infiltrado crônico linfocitário difuso e de baixa intensidade em todas as neoplasias avaliadas.

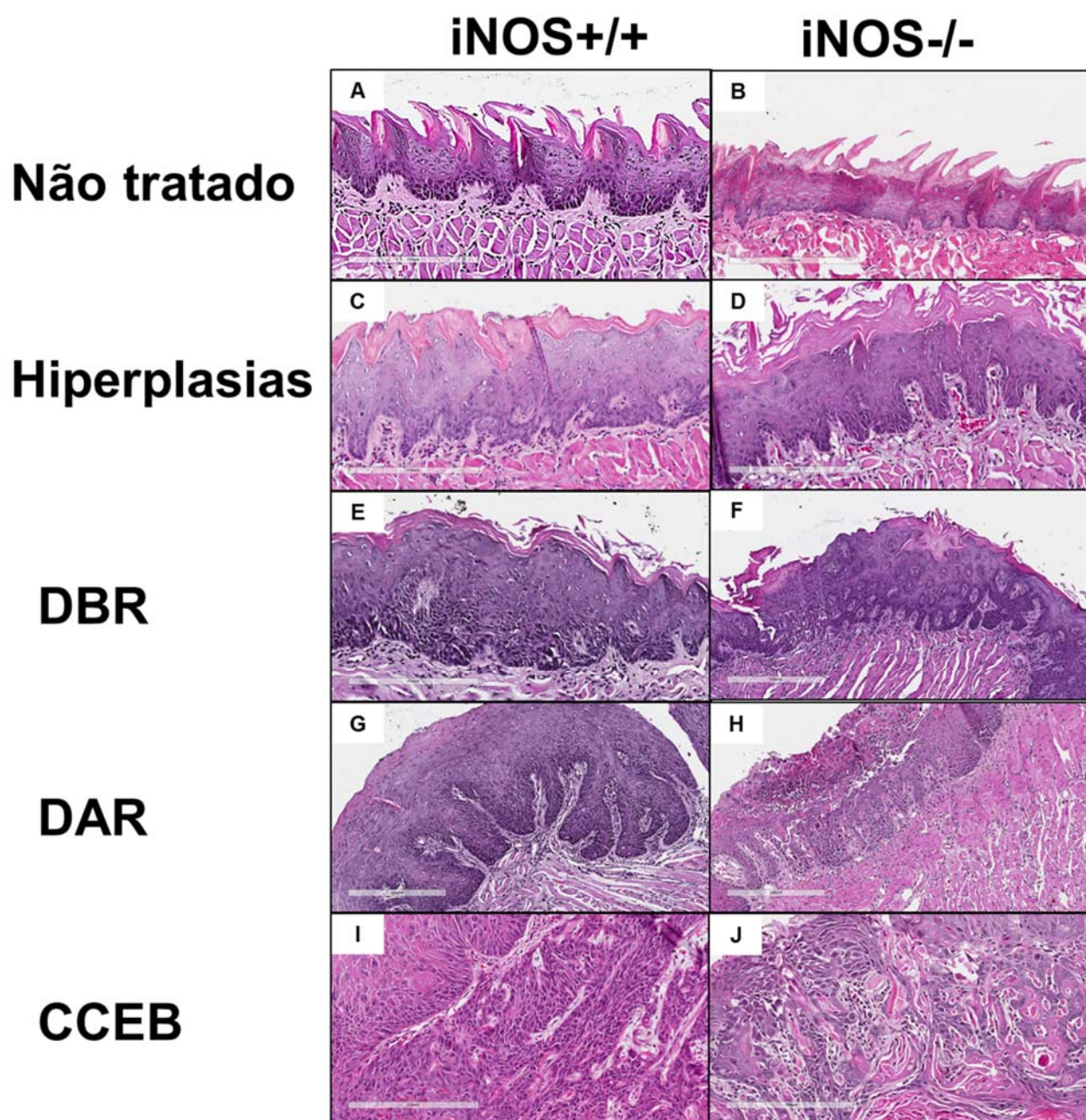


Figura 6: Padrões das características histológicas diagnosticados nos camundongos iNOS ^{+/+} e iNOS ^{-/-}; (A) e (B) epitélio normal (H&E, 200x), (C) e (D) epitélio hiperplásico (H&E, 200x), (E) e (F) displasia epitelial com baixo risco de malignização (DBR) (H&E, 200x), (G) e (H) displasia epitelial com alto risco de malignização (DAR) (H&E, 100x), (I) e (J) carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) (H&E, 200x).

Fonte: dados da pesquisa — fotógrafo: João Paulo Silva Servato.

Tabela 2: Lesões mais graves desenvolvidas e diagnosticadas em cada um dos terços linguais de todos os camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO. Não existem associações estatisticamente significativas entre as tabelas de contingência compostas pelos dados abaixo descritos (Teste Qui-quadrado, $p>0,005$).

Grupos	<i>iNOS</i> ^{+/+} 16s (n=25)			<i>iNOS</i> ^{+/+} 24s (n=25)			<i>iNOS</i> ^{+/+} 32s (n=25)		
	Anterior	Média	Posterior	Anterior	Média	Posterior	Anterior	Média	Posterior
Hiperplasia	1	1	0	3	3	1	2	0	0
DBR	21	15	17	14	6	6	16	8	3
DAR	2	8	6	4	15	10	4	9	10
Carcinoma	1	1	2	4	1	8	3	8	12

Grupos	<i>iNOS</i> ^{-/-} 16s (n=25)			<i>iNOS</i> ^{-/-} 24s (n=25)			<i>iNOS</i> ^{-/-} 32s (n=16)		
	Anterior	Média	Posterior	Anterior	Média	Posterior	Anterior	Média	Posterior
Hiperplasia	10	2	4	1	1	2	0	0	0
DBR	15	19	18	19	9	13	13	2	5
DAR	0	3	3	4	10	8	2	5	8
Carcinoma	0	1	0	1	5	2	1	9	3

DBR: displasia de baixo risco; DAR: displasia de alto risco; s: semanas.

Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 3: Mediana e intervalo do número total de lesões desenvolvidas e diagnosticadas em todas as línguas dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO. Não existem associações estatisticamente significativas entre as tabelas de contingência compostas pelos dados abaixo descritos (Teste Qui-quadrado, $p>0,005$).

Grupos	<i>iNOS</i> ^{+/+} 16s (n=25)	<i>iNOS</i> ^{+/+} 24s (n=25)	<i>iNOS</i> ^{+/+} 32s (n=25)
DBR	4 (2-6)	3 (1-6)	4 (2-6)
DAR	0 (0-4)	2 (0-4)	2 (0-4)
Carcinoma	0 (0-1)	0 (0-2)	1 (0-3)

Grupos	<i>iNOS</i> ^{-/-} 16s (n=25)	<i>iNOS</i> ^{-/-} 24s (n=25)	<i>iNOS</i> ^{-/-} 32s (n=16)
DBR	3 (0-5)	3 (2-8)	3 (2-5)
DAR	0 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-4)
Carcinoma	0 (0-1)	0 (0-2)	1 (0-2)

DBR: displasia de baixo risco; DAR: displasia de alto risco; s: semanas.

Fonte: dados de pesquisa.

A Figura 7, demonstra as médias de todas as lesões displásicas e neoplásicas em todos os tempos e grupos estudados. Embora as médias de incidência do grupo *iNOS*^{+/+} sejam superiores para todas as lesões e tempos estudados, nota-se a existência de diferenças importantes e estatisticamente significantes entre os Grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} apenas em relação às: 1- DBR na 16ª semana comparações realizadas, e 2- DAR na 24ª semana comparações realizadas.

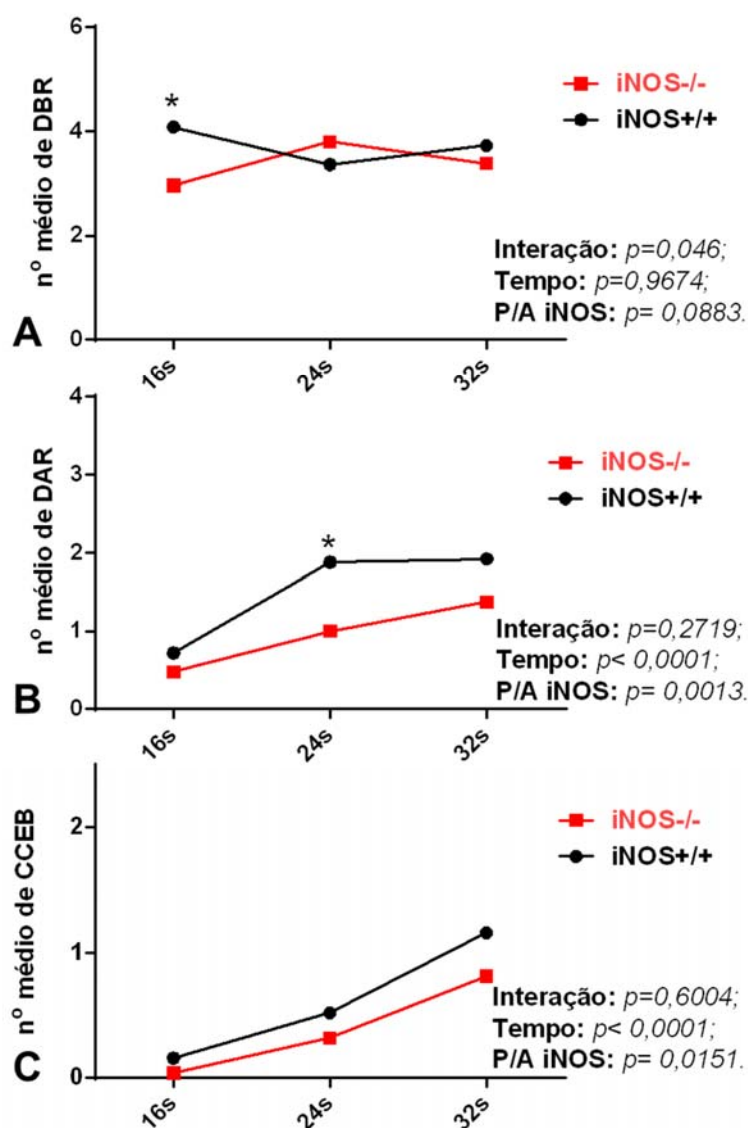


Figura 7: Número médio de DBR, DAR e CCEB em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados com 4NQO em todas as datas analisadas. (A) Comparação entre a incidência média de DBR em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-} tratados com 4NQO

em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p=0,046$; Tempo: $p=0,9674$; Presença/ Ausência de iNOS (P/A iNOS: $p = 0,0883$); (B) Comparação entre a incidência média de DAR em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p = 0,2719$; Tempo: $p < 0,0001$; P/A iNOS: $p = 0,0013$); (C) Comparação entre a incidência média de CCEB em amostras de língua de camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO em todas as datas analisadas (Teste ANOVA bi-caudal; Interação: $p = 0,6004$; Tempo: $p < 0,0001$; P/A iNOS: $p = 0,0151$) Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.3.4. Avaliação histopatológica dos CCEB segundo gradação histopatológica, profundidade de invasão e volume tumoral

A maioria dos CCEB incluindo as lesões desenvolvidas em ambos os grupos tratados foi classificada como bem diferenciada (59/62, 95.1%); apenas três em 62 casos de CCEB, todos pertencendo ao grupo *iNOS*^{+/+}, apresentaram-se como moderadamente diferenciados, visto por um aumento da pleomorfismo celular e diminuição importante da queratinização. A avaliação do modo de invasão do fronte tumoral revelou lençóis celulares sólidos amplos, coesos, vinculados à superfície da lesão em 60 dos 62 CCEB analisados (96,7%). Apenas dois casos, ambos do grupo *iNOS*^{+/+}, demonstraram frentes invasivos compostos por ninhos e cordões celulares dispersos no estroma (3,3%). Não foi possível encontrar nenhum caso demonstrando invasão vascular nas amostras estudadas de ambos os grupos. A Figura 8 ilustra a distribuição dos dados relativos a profundidade de invasão e do volume tumoral em ambos os grupos. A profundidade de invasão e o volume tumoral foram significativamente maiores no grupo *iNOS*^{+/+}, quando comparados com o grupo *iNOS*^{-/-}.

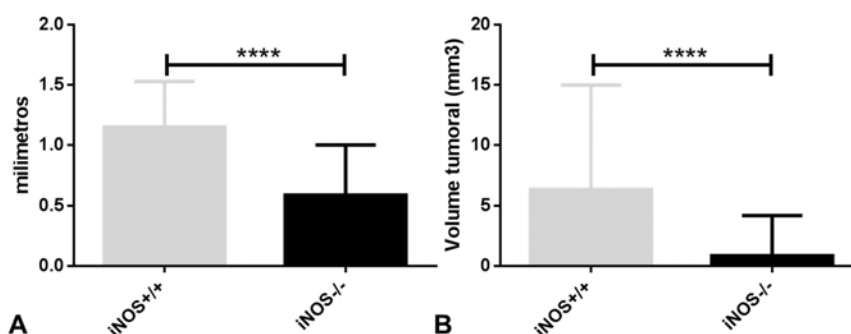


Figura 8: Profundidade de invasão e volume tumoral nos CCEB, representados pela mediana e intervalo de distribuição dos valores. (A) Profundidade de invasão (teste *U* de Mann Whitney; $p < 0,0001$); (B) Volume tumoral (teste *U* de Mann Whitney; $p < 0,0001$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.4. Avaliação da presença de células tumorais circulantes no sangue periférico por meio de citometria de fluxo

A Figura 9 demonstra os dados representativos dos resultados das citometrias em cada um dos grupos estudados. Nos animais dos grupos não tratados (*nt-iNOS*^{+/+}, $n = 8$ e *nt-iNOS*^{-/-}, $n = 8$), bem como nos camundongos do grupo tratado *iNOS*^{-/-} ($n = 4$), não foi possível detectar nenhuma célula tumoral circundante, traduzidas pelo fenótipo: $CD45^+ / CK-19^+$. Em contraste, três dos seis animais (50,0%) do grupo tratado *iNOS*^{+/+}, apresentaram um pequeno número de células tumorais circulantes (média de células $CD45^+ / CK-19^+$ = dois). Não foi possível estabelecer associação significativa entre os grupos estudados e a presença de células tumorais circulantes na amostra analisada.

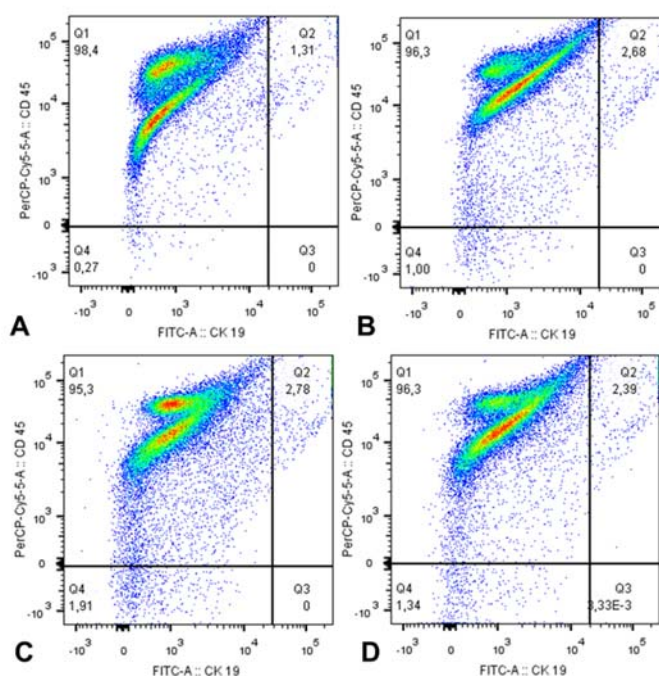


Figura 9: Distribuição da fluorescência específica para os antígenos estudados, segundo o grupo de animais tratados e não tratados (nt). (A) *nt-iNOS*^{-/-}; (B) *nt-iNOS*^{+/+}; (C) *iNOS*^{-/-}; (D) *iNOS*^{+/+}

(Teste Exato de Fisher, $p=0,497$; e Teste Z, $p=0,324$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.5. Análise da expressão gênica relativa de *NOS2* pela técnica da *qPCR* em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasias bucais e carcinoma de células escamosas bucal

Os dados referentes à expressão quantitativa (expressão relativa) comparativa do gene *NOS2* entre o grupo controle (CTR), o grupo de pacientes com LB e o grupo de pacientes com CCEB podem ser observados na Figura 10. Notou-se um aumento progressivo da expressão entre os grupos estudados. Desta forma, evidenciamos que a expressão relativa de *NOS2* é pequena nas amostras de mucosas normais, com aparente aumento na progressão da carcinogênese do epitélio oral, mostrando níveis intermediários de expressão relativa no grupo de LB e níveis altos no grupo de CCEB. No geral, a expressão relativa deste gene, dadas por suas medianas, foi maior no grupo CCEB comparativamente aos grupos LB e CTR. A análise comparativa da expressão relativa entre os grupos descritos acima (pós-teste de Dunn), mostrou que as diferenças se encontram entre os grupos CTR (mucosa normal) e CCEB e LB e CCEB. Não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos CTR e LB nas amostras estudadas. As LB de alto e baixo risco de malignização apresentaram valores similares para expressão relativa de *NOS2*. Para os CCEB, observou-se aumento não significativo da expressão de *NOS2* em lesões metastáticas em comparação as não metastáticas.

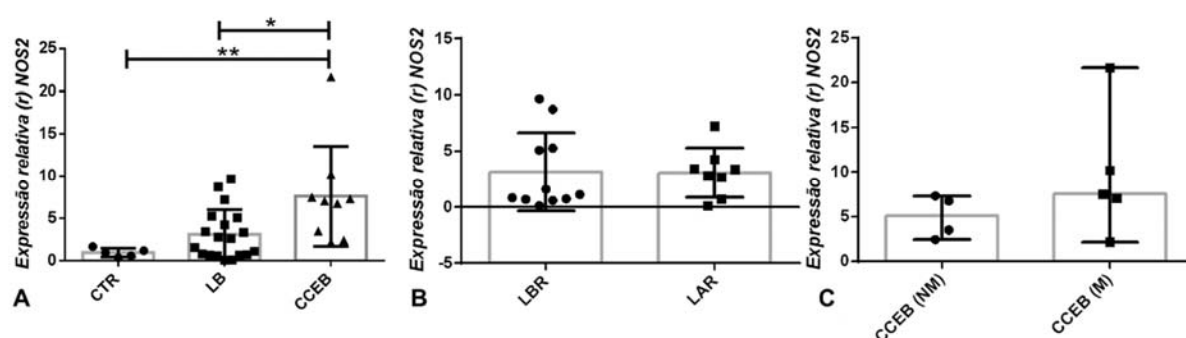


Figura 10: Expressão gênica relativa de *NOS2* pela *qPCR* em amostras de tecido humano provenientes de amostras controle, leucoplasia bucal e carcinomas. Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Grupo de

mucosa normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinomas (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0058$); (B) LB com alto risco de malignização (LAR) e LB com baixo risco de malignização (LBR) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,8287$); . (C) CCEB metastático (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,2857$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.6. Avaliação da imuno-marcação pela técnica de imuno-histoquímica da proteína iNOS e da modificação pós-traducional de nitrotirosina, em amostras de tecido humano de mucosa normal, leucoplasias e carcinoma de células escamosas bucal.

A Figura 11, demonstra os padrões das imuno-marcações de iNOS e Nitrotirosina nas amostras de tecido humano estudados. Os dados referentes à avaliação semiquantitativa da marcação imuno-histoquímica da proteína iNOS entre o grupo controle, o grupo de pacientes com LB e o grupo de pacientes com CCEB podem ser observados na Figura 12.

A imuno-marcação de iNOS nas amostras de tecido de mucosas normais, foi difusa, de intensidade fraca, disposta predominantemente no compartimento citoplasmático. Os 14 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual 3, dispondo seus valores entre um intervalo de 1 a 4. A imuno-marcação de iNOS nas amostras de tecido provenientes de LB, foi difusa, de intensidade fraca, disposta predominantemente no compartimento citoplasmático.

Os 42 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual a 4, dispondo seus valores entre um intervalo de zero a 12. Também para os CCEB, a imuno-marcação de iNOS foi difusa, de intensidade fraca, disposta predominantemente no compartimento citoplasmático. Os 85 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual a 4, dispondo seus valores entre zero e 12.

Percebeu-se um aumento progressivo da mediana de imuno-marcação entre os grupos estudados, de forma que, na mucosa bucal normal, iNOS mostrou-se reduzida, aumentando para LB e CCEB. A análise comparativa da imuno-marcação de iNOS entre os grupos descritos acima mostrou que a diferença significativa se deu entre os grupos controle e CCEB.

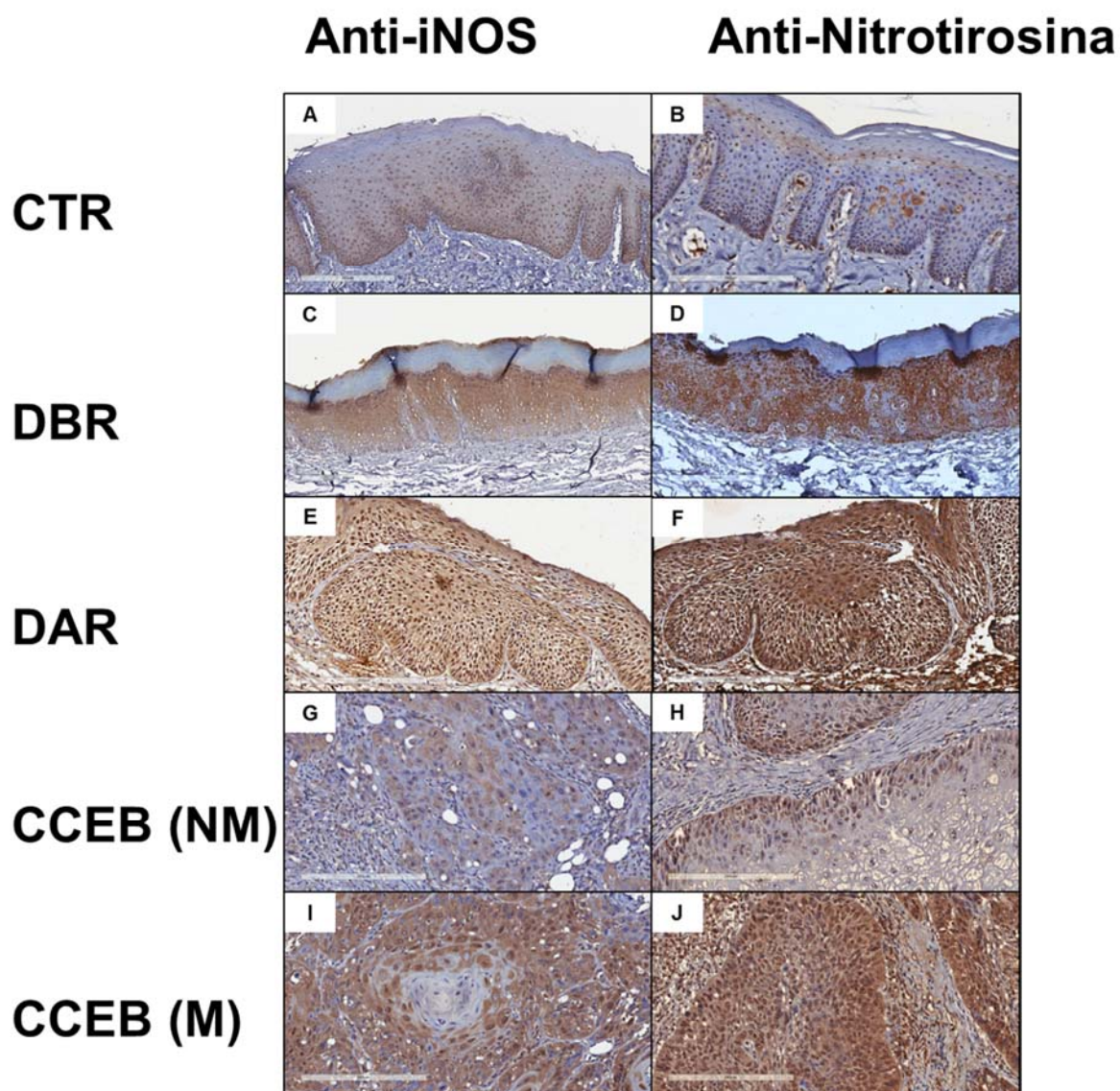


Figura 11: Padrões das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina em amostras de tecido humano provenientes de de: (A) e (B) mucosa normal (CTR), (C) e (D) displasia epitelial com baixo risco de malignização (DBR), (E) e (F) displasia epitelial com alto risco de malignização (DAR), (G) e (H) carcinoma de células escamosas bucal não metastático [CCEB(NM)] e (I) e (J) carcinoma de células escamosas bucal metastático [CCEB(M)]. Fonte: dados da pesquisa — fotógrafo: João Paulo Silva Servato.

Analisando o grupo de LB segundo o risco de malignização, evidencou-se tendência de aumento, não significativo, na imuno-marcação de iNOS para o grupo LAR (mediana de *Quickscore*: 8, range: 0-12) quando comparado com LBR (mediana de *Quickscore*: 4, range: 0-10) e CTR (mediana de *Quickscore*: 3, variação: 1-8).

Para os CCEB pode-se perceber aumento significativo na imuno-marcação de iNOS no grupo de CCEBM (mediana de *Quickscore*: 6, variação: 0-12) comparativamente aos CCEBNM (mediana de *Quickscore*: 3,5, variação: 0-12).

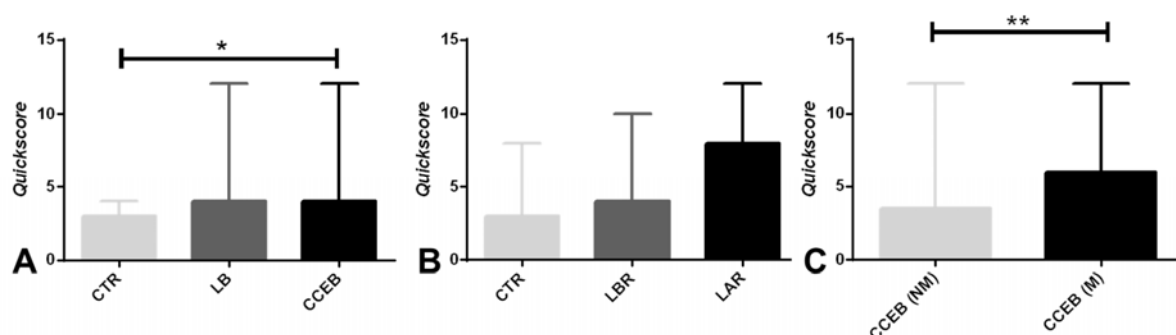


Figura 12: Imuno-marcação de iNOS em amostras de tecido humano provenientes de mucosa normal, leucoplasias bucais de alto risco e baixo risco de transformação maligna e carcinoma de células escamosas bucal (CCEB). Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Tecido normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0280$); (B) LB com alto de malignização (LAR) e LB com baixo risco de malignização (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,1064$); (C) CCEB metastático (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,0078$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

Os dados referentes à marcação imuno-histoquímica da modificação pós-traducional nitrotirosina entre o grupo controle de mucosas normais, o grupo de pacientes com LB e o grupo de pacientes com CCEB podem ser observados na Figura 13. A imuno-marcação de nitrotirosina nas amostras de tecido de mucosas normais, foi difusa, de intensidade fraca, disposta predominantemente no compartimento citoplasmático. Os 14 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual a 4, dispondo seus valores entre um intervalo de 1 a 6. Para as LB, a

imuno-marcação de nitrotirosina foi difusa, de intensidade fraca, disposta predominantemente no compartimento citoplasmático. Os 42 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual 6, dispondo seus valores entre um intervalo de zero a 18. Nos CCEB, a imuno-marcação em pasrã qualitativo semelhante ao encontrado para as LB. Os 85 casos analisados apresentaram mediana de *Quickscore* igual a 5, dispondo seus valores entre um intervalo de zero a 18. Assim, pode-se demonstrar uma tendência de aumento progressivo na mediana da imuno-marcação entre os grupos estudados. No geral, a imuno-marcação de nitrotirosina foi maior no grupo LB do que nos grupos CCEB e CTR, mas nao foi estatisticamente significativas. Resultado semelhante doi obtido wuando da analise da imunimarcação das LB LAR e LBR. Embora mais elevada nas LAR (mediana 6,9, range: 0-18), não foi possivel encontrar diferença significativa para as LBR (mediana de *Quickscore*: 6, range: 0-18) e para a expressão em mucosa normal (mediana de *Quickscore*: 4, range: 1-6).

Segregando os casos de CCEB em metastático e não-metastático, notou-se aumento significativo na imuno-marcação de nitrotirosina no grupo metastático (mediana de *Quickscore*: 7,5, range: 0-18) quando comparada ao grupo não-metastático (mediana de *Quickscore*: 4, range: 1-12).

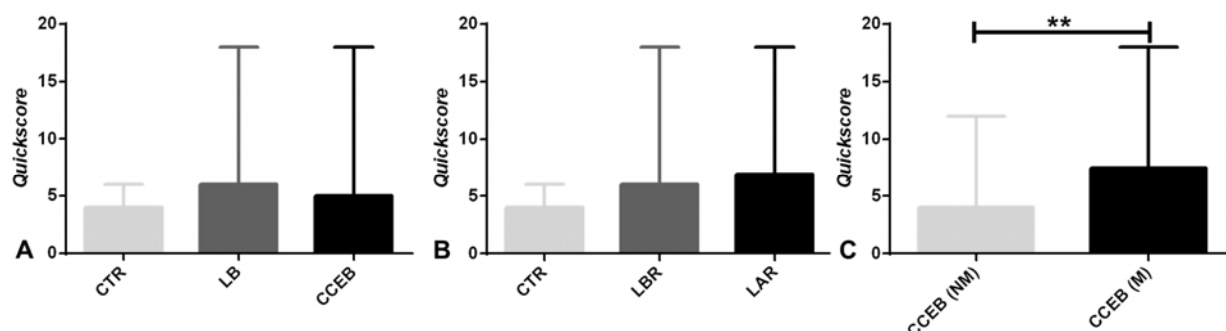


Figura 13: Imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de tecido humano provenientes de mipucosa normal, leucoplasia bucal e carcinomas. Dados expressos como mediana e intervalo (variação). Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos. (A) Mucosa normal (CTR), leucoplasia bucal (LB) e carcinomas (CCEB) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p=0,0613$); (B) LB de alto risco de malignização (LAR) e LB com baixo risco de malignização (LBR) (teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn; $p= 0,1360$); (C) Carcinomas

metastáticos (CCEBM) e não-metastático (CCEBNM) (teste *U* de Mann Whitney; $p=0,0015$).

Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.7. Correlação entre imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina nos grupos estudados

Foi realizado um estudo de correlação entre a imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina a fim de perceber se existe um padrão de variação entre as expressões imuno-histoquímica estudadas (Figura 14). Os resultados mostram a presença de correlação positiva entre a nitrotirosina e iNOS, mostrando baixo coeficiente "r", sendo significativa para os grupos de LB e CCEB.

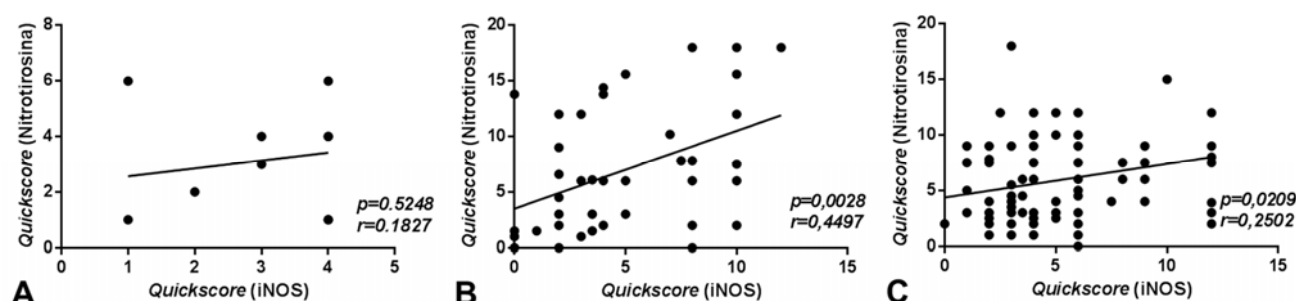


Figura 14: Análise de correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina (Teste de correlação de Spearman, r = coeficiente de variação). (A) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para mucosa normal (Teste de correlação de Spearman, $r=0,1827$; $p=0,5248$); (B) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para as leucoplasias bucais (LB) (teste Spearman, $r=0,4497$; $p=0,0028$); (C) Correlação entre as imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina para o grupo de carcinomas (CCEB) (Teste de correlação de Spearman, $r=0,2502$; $p=0,0209$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.8. Análise de sobrevida global para os pacientes com carcinoma de células escamosas e sua relação com imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina

A análise de sobrevida global foi realizada para todos os 85 casos de CCEB em conjunto. A mediana de sobrevivência global foi de 53 meses, e as taxas de sobrevivência em 5 e 10 anos foram 49,0% e 41,1%, respectivamente. Os resultados das análises univariadas da sobrevida global estão apresentados na Figura 15. Apenas para nitrotirosina foi possível observar uma associação entre a baixa sobrevida e a alta expressão de nitrotirosina nos CCEB.

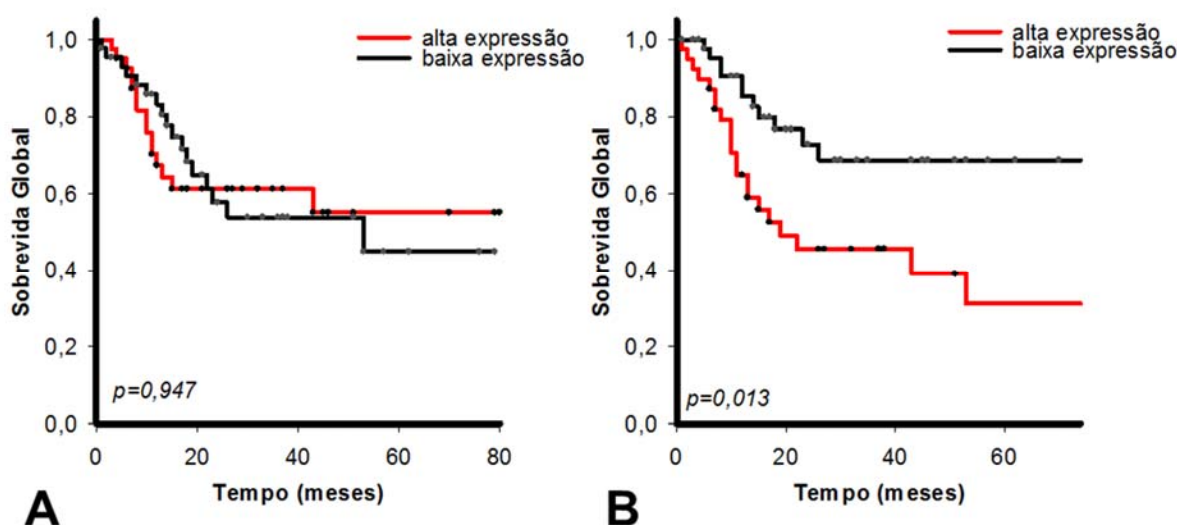


Figura 15: Curvas de sobrevida global (Kaplan–Meier) para os pacientes diagnosticados com CCEB, estratificadas de acordo com as medianas de imuno-marcação para iNOS e nitrotirosina. (A) Análise univariada da sobrevida global considerando alta (*Quickscore* ≤ 6) e baixa (*Quickscore* > 6) expressão de iNOS (Teste Log-Rank, $p=0,947$); (B) Análise univariada da sobrevida global considerando a alta P (*Quickscore* ≤ 5) e baixa (*Quickscore* > 5) expressão de nitrotirosina (Teste Log-Rank, $p=0,013$). Fonte: dados da pesquisa — elaboração: João Paulo Silva Servato.

4.9. Associação da expressão da proteína iNOS e nitrotirosina, com fatores clinicopatológicos relativos aos casos de leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas bucal

A Tabela 4 e 5 mostram, respectivamente, os dados relativos a associação entre a imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina com os fatores sociodemográficos e clinicopatológicos das LB, a partir de valores *cut-off* de baixa e alta expressão antigênica. Não houve associação estatisticamente significativas entre a imuno-marcação de iNOS e de nitrotirosina para o grupo LB, em nenhum dos parâmetros estudados.

Análise semelhante foi realizada para iNOS e nitrotirosina para as características sociodemográficas e clinicopatológicas referentes aos casos de CCEB. Por esta análise, foi possível identificar existência de associação estatisticamente significativas entre alta imuno-marcação de iNOS no grupo CCEB com doença avançada, presença de metástases, e recidiva (Tabela 6). De

forma bastante similar, percebeu-se associação estatisticamente significativa alta expressão de nitrotirosina no grupo CCEB com os seguintes parâmetros clinicopatológicos: tamanho, estadiamento clínico, presença de metastases, e evolução clínica dos pacientes (Tabela 7).

A Tabela 8, apresenta a distribuição dos casos de LB bucal segundo as medianas de marcação de iNOS e nitrotirosina e os diferentes parâmetros sociodemográficos e clinicopatológicos. Não houve diferenças estatisticamente significativas na mediana da imunomarcação de iNOS para o grupo LB entre os vários parâmetros clinicopatológicos analisados. Na Tabela 9, observa-se a distribuição dos casos de CCEB segundo as medianas de marcação de iNOS e nitrotirosina e os diferentes parâmetros sóciodemográficos e clinicopatológicos estudados. Neste caso, observou-se diferenças estatisticamente significativas na mediana de iNOS no grupo CCEB para os seguintes parâmetros clinicopatológicos analisados: estadiamento, presença de metástases *e recidiva*. Para a nitrotirosina, as diferenças recaíram sobre estadiamento clínico, presença de metástases.

Tabela 4: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de iNOS em amostras de leucoplasia bucal.

Imuno-marcação (iNOS)	Sexo			Idade			Tabagismo			Etilismo			H.C.F.			Classificação Clínica		
	M	F	<i>p</i> *	≤60 a	>60 a	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> ‡	Sim	Não	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> ‡	H	NH	<i>p</i> *
Alta (QS > 4,5)	7	10	N.S.	13	4	N.S.	12	5	N.S.	5	12	N.S.	3	14	N.S.	11	6	N.S.
Baixa (QS ≤ 4,5)	16	9		14	11		21	4		9	16		2	23		17	8	
Imuno-marcação (iNOS)	Sintomatologia			Tamanho			Localização			Histologia			Malignização			Condição Clínica		
	Sim	Não	<i>p</i> ‡	≤ 200 mm2	> 200 mm2	<i>p</i> *	Única	Múltipla	<i>p</i> ‡	LAR	LBR	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> ‡	Vivo	Morto	<i>p</i> ‡
Alta (QS > 4,5)	2	15	N.S.	8	9	N.S.	16	1	N.S.	6	11	N.S.	4	13	N.S.	16	1	N.S.
Baixa (QS ≤ 4,5)	3	22		10	15		20	5		6	19		3	22		24	1	

*:Teste Qui-quadrado; \ddagger : Teste de Fischer; a: ano; F: feminino; H: homogênea; H.C.F: histórico de câncer familiar; LAR: leucoplasia de alto risco; LBR: leucoplasia de baixo risco; mm: milímetro M: masculino; NH: não-homogênea. Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 5: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de leucoplasia bucal.

Imuno-marcação (Nitrot)	Sexo			Idade			Tabagismo			Etilismo			H.C.F.			Classificação Clínica		
	M	F	p*	≤60 a	>60 a	p*	Sim	Não	p‡	Sim	Não	p*	Sim	Não	p‡	H	NH	p*
Alta (QS > 7,0)	9	7	N.S.	11	5	N.S.	13	3	N.S.	6	10	N.S.	1	15	N.S.	8	8	N.S.
Baixa (QS ≤ 7,0)	14	12		16	10		20	6		8	18		4	22		20	6	
Imuno-marcação (Nitrot)	Sintomatologia			Tamanho			Localização			Histologia			Malignização			Condição Clínica		
	Sim	Não	p‡	≤ 200 mm2	> 200 mm2	p*	Única	Múltipla	p‡	LAR	LBR	p*	Sim	Não	p‡	Vivo	Morto	p‡
Alta (QS > 7,0)	3	13	N.S.	7	9	N.S.	14	2	N.S.	6	10	N.S.	4	12	N.S.	15	1	N.S.
Baixa (QS ≤ 7,0)	2	24		11	15		22	4		6	20		3	23		25	1	

*:Teste Qui-quadrado; \ddagger : Teste de Fischer; a: ano; F: feminino; H: homogênea; H.C.F: histórico de câncer familiar; LAR: leucoplasia de alto risco; LBR: leucoplasia de baixo risco; mm: milímetro M: masculino; NH: não-homogênea. Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 6: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de iNOS em amostras de carcinoma de células escamosas bucal.

Imuno-marcção (iNOS)	<u>Sexo</u>			<u>Idade</u>			<u>Tabagismo</u>			<u>Etilismo</u>			<u>H.C.F.</u>			<u>Sintomatologia</u>			<u>Evolução</u>		
	M	F	<i>p</i> *	≤60 a	>60 a	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> ‡	Sim	Não	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> *	≤6 m	>6 m	<i>p</i> *
Alta (QS > 5)	33	8	N.S.	5	36	N.S.	38	3	N.S.	33	8	N.S.	17	21	N.S.	25	13	N.S.	5	5	N.S.
Baixa (QS ≤ 5)	31	13		6	38		38	6		34	10		20	18		31	11		7	10	
Imuno-marcção (iNOS)	<u>Tamanho</u>			<u>Localização</u>			<u>Estadiamento</u>			<u>Metástase</u>			<u>Histologia</u>			<u>Recidiva</u>			<u>Condição Clínica</u>		
	≤4 cm	>4 cm	<i>p</i> *	L + A	Outros	<i>p</i> *	I	A	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> *	BD	MD/PD	<i>p</i> *	Sim	Não	<i>p</i> *	Vivo	Morto	<i>p</i> *
Alta (QS > 5)	20	19	N.S.	26	15	N.S.	12	29	0,006	29	12	0,006	13	20	N.S.	4	30	0,026	15	26	N.S.
Baixa (QS ≤ 5)	20	16		30	14		27	17		17	27		20	15		12	19		17	27	

*:Teste Qui-quadrado; ‡: Teste de Fischer; a: ano; A: avançado; BD: bem diferenciado; cm: centímetro; F: feminino; H.C.F: histórico de câncer familiar; I: inicial; L+A: língua + assoalho; m: meses; M: masculino; MD/PD: Moderada e pobremente diferenciado. Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 7: Associação entre as variáveis estudadas e a imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de carcinoma de células escamosas bucal.

Imuno-marcação (Nitrot)	Sexo			Idade			Tabagismo			Etilismo			H.C.F.			Sintomatologia			Evolução		
	M	F	p*	≤60 a	>60 a	p‡	Sim	Não	p‡	Sim	Não	p*	Sim	Não	p*	Sim	Não	p*	≤6 m	>6 m	p*
Alta (QS > 6)	30	9	N.S.	3	36	N.S.	36	3	N.S.	30	9	N.S.	20	15	N.S.	27	10	N.S.	12	26	N.S.
Baixa (QS ≤ 6)	34	12		8	38		40	6		37	9		17	24		28	15		23	20	
Imuno-marcação (Nitrot)	Tamanho			Localização			Estadiamento			Metástase			Histologia			Recidiva			Condição Clínica		
	≤4 cm	>4 cm	p*	L + A	Outros	p*	I	A	p‡	Sim	Não	p*	BD	MD/PD	p*	Sim	Não	p*	Vivo	Morto	p*
Alta (QS > 6)	13	21	0,031	25	14	N.S.	3	36	<0,001	29	10	0,001	15	14	N.S.	6	25	N.S.	21	18	0,017
Baixa (QS ≤ 6)	27	14		31	15		23	23		17	29		18	20		12	23		12	34	

*:Teste Qui-quadrado; ‡: Teste de Fischer; a: ano; A: avançado; BD: bem diferenciado; cm: centímetro; F: feminino; H.C.F: histórico de câncer familiar; I: inicial; L+A: língua + assoalho; m: meses; M: masculino; MD/PD: Moderada e pobremente diferenciado. Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 8: Mediana e intervalo das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina segregadas de acordo com os sub-grupos das variáveis estudadas em amostras de leucoplasia bucal.

Variáveis		Imuno-marcação (iNOS)	<i>p</i> *	Imuno-marcação (Nitrotirosina)	<i>p</i> *
Sexo	M	3,5 (0-10)	N.S.	4,5 (0-18)	N.S.
	F	5,0 (0-12)		6,0 (0-18)	
Idade	≤60 a	4,0 (0-10)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	>60 a	3,0 (0-12)		6,0 (0-18)	
Tabagismo	Sim	4,0 (0-12)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	Não	5,0 (0-10)		6,0 (0-15)	
Etilismo	Sim	4,0 (0-10)	N.S.	6,0 (0-15)	N.S.
	Não	3,5 (0-12)		6,0 (0-18)	
H.C.F.	Sim	7,5 (1-10)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	Não	4,0 (0-12)		2,0 (1,5-7,8)	
Classif. Clínica	H	3,8 (0-10)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	NH	4,0 (0-12)		8,3 (1,5-18)	
Sintomatologia	Sim	4,0 (0-12)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	Não	4,0 (0-10)		10,2 (1,5-18)	
Tamanho	≤ 200 mm ²	4,0 (0-10)	N.S.	6,0 (1-18)	N.S.
	>200 mm ²	3,8 (0-12)		3,75 (0-18)	
Localização	Única	3,8 (0-10)	N.S.	6,0 (0-18)	N.S.
	Múltipla	4,0 (0-12)		4,0 (1-18)	
Classif. Histológica	LAR	5,0 (0-12)	N.S.	6,9 (0-18)	N.S.
	LBR	4,0 (0-10)		6,0 (0-18)	
Malignização	Sim	7,0 (2-12)	N.S.	7,5 (3-18)	N.S.
	Não	4,0 (0-10)		6,0 (0-18)	
Condição Clínica	Vivo	7,0 (2-12)	N.S.	10,5 (0-18)	N.S.
	Morto	4,0 (0-10)		10,5 (3-18)	

*: Teste de Mann Whitney; a: ano; Classif.: classificação; F: feminino; H: homogênea; H.C.F: histórico de câncer familiar; LAR: leucoplasia de alto risco; LBR: leucoplasia de baixo risco; mm: milímetros; M: masculino; NH: não-homogênea. Fonte: dados de pesquisa.

Tabela 9: Mediana e intervalo das imuno-marcações de iNOS e nitrotirosina segregadas de acordo com os sub-grupos das variáveis estudadas em amostras de carcinomas de células escamosas.

Variáveis		Imuno-marcação (iNOS)	<i>p</i> *	Imuno-marcação (Nitrotirosina)	<i>p</i> *
Sexo	M	5,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	5,0 (0-18)	<i>N.S.</i>
	F	4,0 (1-12)		4,0 (1-12)	
Idade	≤60 a	4,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	2,5 (1-18)	<i>N.S.</i>
	>60 a	4,0 (1-12)		5,3 (0-15)	
Tabagismo	Sim	4,5 (0-12)	<i>N.S.</i>	5,0 (0-18)	<i>N.S.</i>
	Não	4,0 (3-12)		5,0 (1-18)	
Etilismo	Sim	4,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	4,5 (0-18)	<i>N.S.</i>
	Não	4,0 (1-12)		5,8 (1-15)	
H.C.F.	Sim	4,0 (1-12)	<i>N.S.</i>	6,0 (0-15)	<i>N.S.</i>
	Não	5,0 (0-12)		4,5 (1-18)	
Sintomatologia	Sim	4,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	5,0 (0-15)	<i>N.S.</i>
	Não	5,0 (1-12)		5,0 (1-18)	
Evolução	≤3 m	5,0 (1-12)	<i>N.S.‡</i>	4,0 (1-18)	<i>N.S.‡</i>
	>3-≤6 m	4,0 (0-12)		4,0 (0-12)	
	>6 m	4,5 (1-12)		6,0 (1-12)	
Tamanho	≤4 cm	4,5 (0-12)	<i>N.S.</i>	4,0 (1-15)	<i>N.S.</i>
	>4 cm	5,0 (1-12)		6,0 (0-18)	
Localização	Língua	4,0 (0-12)	<i>N.S.‡</i>	5,0 (1-12)	<i>N.S.‡</i>
	Assoalho	5,0 (1-12)		4,5 (2-18)	
	Outros	5,0 (1-12)		5,0 (1-10)	
Estadiamento	Inicial	3,0 (0-12)	<u><i>0,0026</i></u>	3,0 (0-10)	<u><i><0,0001</i></u>
	Avançado	5,5 (1-12)		7,5 (1-18)	
Metástase	Sim	6,0 (1-12)	<u><i>0,0078</i></u>	7,5 (0-18)	<u><i>0,0015</i></u>
	Não	3,5 (0-12)		4,0 (1-12)	
Histologia	BD	4,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	4,5 (1-15)	<i>N.S.</i>
	MD/PD	4,0 (0-12)		5,0 (1-12)	
Recidiva	Sim	3,5 (2-12)	<u><i>0,0453</i></u>	3,3 (0-15)	<i>N.S.</i>
	Não	5,0 (1-12)		6,0 (1-18)	
Condição Clínica	Vivo	4,0 (0-12)	<i>N.S.</i>	4,0 (0-18)	<i>N.S.</i>
	Morto	4,0 (1-12)		7,5 (1-12)	

*: Teste de Mann Whitney; ‡: Teste de Kruskal-Wallis; a: ano; cm: centímetro; BD: bem diferenciado; F: feminino; H.C.F: histórico de câncer familiar; m: meses; M: masculino; MD/PD: Moderada e pobremente diferenciado. Fonte: dados de pesquisa.

5.0. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da enzima iNOS no processo de carcinogênese bucal, avaliando paralelamente um processo de carcinogênese experimental induzida em animal, e a carcinogênese humana. No modelo experimental, avaliou-se o processo a partir das análises macroscópica e histológica das lesões induzidas, e da presença de células neoplásicas circulantes; na carcinogênese humana, avaliou-se a expressão funcional de *NOS2* pela quantificação de seu RNAm, e pela imuno-marcação da proteína iNOS e da modificação pós-traducional nitrotirosina em amostras de mucosa bucal (CTR), lesões cancerizáveis (LB) e nos CCEB.

Os dados que obtivemos demonstraram, inequivocamente, que a iNOS tem papel fundamental na modulação da carcinogênese bucal. Do ponto de vista do modelo animal, tanto o desenvolvimento de lesões cancerizáveis (displasias), quanto neoplásicas foram menos frequentes nos animais *knockout* para *NOS2*. Associado à isso notamos um aumento da expressão gênica e proteica de iNOS em amostras de tecido humano, de forma progressiva com a evolução natural das doenças. Observou-se um aumento de iNOS nas LB comparada a mucosa normal, que se acentuou nos CCEB, sendo maior ainda nos casos metastáticos.

Previamente à discussão de nossos resultados específicos quanto ao fenômeno da carcinogênese bucal e sua relação com iNOS, julgamos oportuno discutir alguns aspectos do experimento não relacionado às lesões estudadas, mas ao processo de exposição ao carcinógeno e seus efeitos não carcinogênicos diretos.

Pareceu-nos importante neste contexto o volume hídrico (carcinógeno) consumido pelos animais. No presente experimento, os animais foram agrupados em número de cinco em gaiolas, sendo impossível contabilizar o consumo individual de carcinógeno. Todavia, esta observação é fundamental para confirmar que, de fato, os animais foram expostos ao desafio químico, denotando uma exposição semelhante entre os diferentes grupos tratados. A literatura parece não dar importância a estes dados, não existindo, aparentemente, nenhum artigo publicado que reporte tais valores de exposição (consumo). A baixa mortalidade dos animais referida por Tang *et al.*, 2004 e a demonstração de 100% de produção de tumores nos grupos expostos, podem ter desestimulado os investigadores a registrar este dado e lhe dar uma importância maior. Nossos resultados mostraram semelhança de exposição entre os grupos tratados *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{+/+}, o que garante, a priori, um desafio semelhante e aceitável para comparação.

Nossos resultados mostram ainda uma mortalidade animal próxima a 20%, resultado semelhante a nossas experiências anteriores com o modelo (FARIA *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2014). Para registro, embora não tenha sido incluído nos resultados, nossos estudos pilotos com o modelo, utilizando o dobro da dose no desafio carcinogênico produziu uma alta mortalidade nos animais *knockout* (100% em 4 semanas), fato este que não foi ainda devidamente explorado.

Na mesma linha de discussão, pouco tem sido discutido na literatura sobre o efeito metabólico do desafio com 4NQO nestes animais. Nossos resultados mostraram que a ingestão da droga produziu perda ponderal corporal e hepática. Estes dados são corroborados por outros autores (BARCESSAT *et al.*, 2014), os quais confirmam que mesmo a aplicação tópica de 4NQO sobre a língua de ratos por 16 semanas, pode causar necrose hepática lobular focal, degeneração dos túbulos renais, e diminuição da celularidade na polpa branca do baço. Além disto, o tratamento com 4NQO diluído na água de beber, gera uma grande quantidade de resíduos tóxicos, o que pode ser também danoso ao organismo humano quando de sua manipulação (CASTELLANI, 1985). Seu potencial carcinogênico é bem definido, mas não existem atualmente guias disponíveis sobre como tais resíduos devem ser tratados para minimizar seu potencial contaminante e carcinogênico, e por consequência, reduzir a possibilidade de agressão ao meio ambiente e aos pesquisadores expostos na sua manipulação.

Postula-se que a tumorigênese seja um fenômeno complexo que envolve múltiplas fases e que ocorre em decorrência do acúmulo de sucessivas e progressivas alterações genéticas específicas (STEIDLER, READE, 1986; VERED *et al.*, 2005). Os conhecimentos adquiridos desse processo foram alcançados graças aos estudos epidemiológicos, de biologia celular e genética molecular em humanos. Muitos outros, todavia, advieram de modelos de carcinogênese química em animais como ratos, hamster e, menos comumente, camundongos (SHKLAR, 1999). Desde os primeiros relatos sobre a carcinogênese bucal experimental, em 1954 por John Salley, até os dias atuais, muitos modelos de carcinogênese oral foram propostos, os quais se distinguem quanto ao método de aplicação do carcinógeno, tipo e a concentração do carcinógeno empregado, tempo de aplicação e de sacrifício e o tipo de linhagem animal empregada (SOLT, POLVERINI, CALDERON, 1987; HAWKINS *et al.*, 1994; DAYAN *et al.*, 1997; TANG *et al.*, 2004).

O 4NQO é um potente carcinógeno, solúvel em água, com efeitos tanto mutagênico quanto carcinogênico, ambos mediados pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio e também pela ação direta do 4HAQO sobre o DNA. Esta ligação de forma específica aos resíduos de guanina, induz a substituição destes por resíduos de pirimidina

(NUNOSHIBA, DEMPLE, 1993; KANOJIA, VAIDYA, 2006). Estas características têm favorecido seu emprego nos modelos experimentais de carcinogênese, em especial porque reproduzem aspectos fundamentais da carcinogênese relacionada a agressão actínica e de produtos do tabaco.

Todavia, a susceptibilidade à carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO tem se mostrado altamente variável entre as espécies de animais; em geral, os ratos são os animais mais susceptíveis (IDE *et al.*, 2001). Quanto aos camundongos, a susceptibilidade parece variar com a espécie e com a forma de aplicação do carcinógeno. Alguns trabalhos têm mostrado que o aparecimento de displasias e tumores após pincelamento de 4NQO ocorre em baixa frequência nos camundongos da linhagem C57BL6. Neste sentido, a ingestão do carcinógeno tem se mostrado mais eficaz na carcinogênese, tendo em vista que, por esta metodologia, há 100% de formação de câncer após 28 dias de seguimento (TANG *et al.*, 2004).

Além disto, o uso do 4NQO apresenta outras vantagens sobre o DMBA, como: ausência de inflamação, necrose e perda da barreira epitelial após a sua interrupção; precocidade no processo de iniciação tumoral (cerca de seis semanas), ausência de efeito irritativo na mucosa, desenvolvimento de tumores bem diferenciados similares aos observados nas lesões incipientes em humanos, e desenvolvimento de lesões cancerizáveis e malignas mesmo após a interrupção da sua aplicação (STEIDLER; READE, 1986; NAUTA *et al.*, 1995; HAWKINS *et al.*, 1994).

Comparativamente ao que usualmente se observa na carcinogênese bucal humana, processo de carcinogênese experimental difere daquele em duas situações: número de lesões e em sua localização. No modelo, várias lesões surgiram simultaneamente localizadas no dorso lingual no sentido anteroposterior. Estes resultados confirmam os achados de Tang *et al.*, 2004, mostrando também que o local da língua mais acometido é a região posterior. A superfície ventral foi raramente afetada em ambos os grupos (menos de 10% das lesões acometeram essa área). Visualmente, não foi evidenciada nenhuma lesão em outro sítio da cavidade bucal. O maior envolvimento do dorso lingual se deve, provavelmente, ao modo como os camundongos bebem água, o que torna essa superfície o local da cavidade oral com maior contato com o carcinógeno. Além disto, há evidências de que a região dorsal da língua é mais rica em 4NQO redutase, o que favorece a presença nesta região de maior concentração de 4NAQO, o metabólito ativo do 4NQO (BOOTH, 1994). A presença de lesões em diferentes estágios de progressão da carcinogênese, confirmadas histologicamente como

displasias e carcinomas, comprova que parece haver uma susceptibilidade temporal que ainda precisa ser esclarecida.

Na carcinogênese humana, tem sido relatado o processo de cancerização de campo, mas, usualmente, as lesões acometem um único sítio específico. As alterações produzidas no processo de agressão neste modelo experimental são semelhantes à carcinogênese actínica e química (tabaco). Há diferenças importantes nesta multiplicidade de alterações teciduais que se tornam indícios de susceptibilidade a ser confrontadas como a tese da cancerização de campo, e que mereceriam maior investigação (NUNOSHIBA, DEMPLE, 1993; BOOTH, 1994; KANOJIA, VAIDYA, 2006).

Outro aspecto curioso percebido no modelo experimental diz respeito a gradação histológica dos tumores identificados, quando comparados aos da carcinogênese bucal humana. Geralmente, nos tumores animais, as lesões são bem diferenciadas, reproduzindo a carcinogênese actínica labial humana, não só pela diferenciação, mas também pela progressão menos agressiva nesta região. No humano, contrariamente, os tumores linguais são vistos no ventre e borda de língua, raramente em sua superfície dorsal, sendo mais agressivos com marcante potencial metastático. (NUNOSHIBA, DEMPLE, 1993; KANOJIA, VAIDYA, 2006).

Aspecto relevante na experiência de Tang *et al.*, 2004 sobre a carcinogênese lingual por ingestão de 4NQO, foi a descrição macroscópica do processo. Segundo o autor, a progressão das alterações histológica seria percebida pela identificação de modificações na superfície lingual. Estas modificações foram graduadas como leves, moderadas e intensas, servindo também como guia para o monitoramento do processo. Todavia, nossos dados confirmam o que outros grupos vêm observando em outros trabalhos (FARIA *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2014). A propósito, Hawkins *et al.*, 1994, mostraram que a mucosa exposta ao 4NQO pode apresentar uma aparência normal mesmo na presença de um carcinoma invasivo situado profundamente no tecido. De fato, em nosso modelo, alguns camundongos não mostraram evidências de alterações morfológicas na superfície lingual, não obstante sua identificação microscópica. Desta forma, embora a presença das lesões macroscopicamente identificáveis seja um sinal do efeito da agressão química, a sua ausência não exclui que os efeitos da agressão estejam presentes.

A propósito, vale discutir estas observações a luz do modelo de carcinogênese bucal, que passa pela presença de lesões cancerizáveis. Nesta situação, só percebemos o desenvolvimento do câncer, macroscopicamente falando, como processo de múltiplas etapas a partir da identificação das lesões cancerizáveis: queilite actínica, LB e eritroplasias. Nestas

lesões, eventualmente, alterações displásicas estão presentes e, segundo a literatura, principalmente pela aceitação de que estas lesões antecedem a transformação maligna. Várias alterações genéticas têm sido identificadas nestas lesões acompanhando a displasia epitelial, admitidas como parte das alterações que explicam sua evolução para o câncer (WARNAKULASURYIA *et al.*, 2016; ARDUINO *et al.*, 2016). Não conseguimos ainda, em humano, identificar fases anteriores que nos possibilitem estudar o processo pré-clínico mais objetivamente. Neste sentido, o modelo de carcinogênese animal, mesmo com suas limitações de similaridade com a carcinogênese humana, permitiria produzir informações na direção do preenchimento desta lacuna.

Não obstante a limitação da interpretação dos efeitos da indução da carcinogênese a partir da avaliação macroscópica da língua observou-se que, no geral, houve uma tendência ao aumento do número de lesões com dimensões > 2,0mm a medida do avanço do período de observação. Isto foi mais evidente 32ª semana para ambos os grupos. Comparativamente, lesões com dimensões maiores foram menos prevalentes no Grupo *iNOS*^{-/-}, quando comparado ao grupo *iNOS*^{+/+}, sugerindo uma menor tendência para o desenvolvimento de CE nesse grupo. Estes dados foram reforçados pela avaliação microscópica. Nossos resultados mostram que em todos os períodos avaliados o número de lesões DAR e CCEB nos camundongos *iNOS*^{+/+} foi sempre superior ao número de lesões nos animais *iNOS*^{-/-}. Este dado foi acompanhado do fato de que os tumores desenvolvidos em animais *iNOS*^{+/+}, foram em geral maiores e mais infiltrativos que aqueles desenvolvidos em camundongos *iNOS*^{-/-}. Tais dados nos permitem notar que a enzima iNOS e o NO tem papel relevante na modulação dos efeitos carcinogênicos após o tratamento químico com 4NQO.

Outros modelos de carcinogênese química em animal mostraram resultados semelhantes, em que a animais *iNOS*^{-/-}, sempre apresentam carga tumoral menor, não importando o órgão de desenvolvimento da neoplasia, a substância carcinogênica, a dosagem, e as condições utilizados por esses autores (MAEDA, AKAIKE, 1998; AHN *et al.*, 1999; SERIL *et al.*, 2007; SAMANTA *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2010; HIRAKU *et al.*, 2010; MURATA *et al.*, 2012; TAKAHASHI *et al.*, 2013). De forma complementar, um estudo revelou um aumento na expressão da proteína iNOS, pela técnica de imuno-histoquímica em um modelo de carcinogênese bucal induzido pelo 4NQO em língua de ratos Wistar, sugerindo que a expressão de iNOS está associada ao desenvolvimento de carcinomas, bem como sua progressão (RIBEIRO *et al.*, 2007). Além disto, encontraram que imuno-marcação de iNOS aumentou do tecido normal (10%) para o câncer (35%).

Estas alterações também têm sido detectadas em modelos de carcinogênese bucal em hamsters a partir de desafio com 7, 12-dimetilbenz [a] antraceno (DMBA). Chen *et al.* (2000) identificaram reatividade imuno-histoquímica citoplasmática e nuclear para iNOS nos queratinócitos bucais dos animais tratado e sua ausência no grupo não tratado. O mesmo grupo demonstrou em modelo similar a presença do RNAm de *NOS2*, em mucosa da bolsa bucal de hamsters em todos os animais tratados por DMBA, tal presença não era detectável em animais não tratados (CHEN *et al.*, 2002a). Ademais, foi notado por esses autores, neste mesmo modelo experimental da carcinogênese bucal que existe uma associação significativa entre os níveis de iNOS e de p53 (em ambos os níveis transcricional e proteico) (CHEN *et al.*, 2003). Em abordagem subsequente, Chen *et al.* (2005) mostraram que os inibidores de iNOS também poderiam suprimir o desenvolvimento de displasias epiteliais e CCEB no modelo de carcinogênese bucal induzida por DMBA.

A proteína p53 desempenha um papel importante, como um sensor e guardião da integridade genômica em momentos de estresse genômico, resultante da exposição das células a compostos mutagênicos exógenos de origem física e/ou química. O controle da superprodução de NO por p53, sugere que tal proteína pode também estar ativamente envolvida na resposta celular aos produtos mutagênicos endógenos. Além disso, sugere a existência de um *loop de feedback* negativo, onde um dano ao DNA induzido por NO, resulta em acumulação de p53 e subsequente repressão da expressão da enzima iNOS. Tal fenômeno, ressalta um novo mecanismo de regulação do ciclo celular e da interação direta de iNOS e NO com proteínas de reparação do DNA e da apoptose, por meio da sinalização contra danos exógeno e endógenos no DNA dependente de p53. (BRENNAN *et al.*, 1995; FORRESTER *et al.*, 1996; BRENNAN, 2000; BLOCK, GORIN, 2012). Estes achados sugerem uma relação metabólica entre NO e p53, a qual merece ser investigada com mais profundidade.

Recentemente, Li *et al.* (2013) apresentaram um modelo alternativo de carcinogênese bucal em camundongos, o qual desenvolve metástases nos linfonodos cervicais. Tais animais foram submetido a um tratamento com alta dose de 4NQO (200 µg/mL de 4NQO na água de beber por 20 semanas) e acompanhamento estendido até a 35ª semana. Este modelo pode fornecer uma plataforma para o estudo do mecanismo de metástases linfáticas em carcinomas orais. Como mencionado anteriormente, em uma abordagem preliminar de desafio com dose de 100 µg/mL por quatro semanas (dado não mostrado), produziu morte em 100% dos animais *knockout*. No modelo que utilizamos, nenhuma metástase foi evidenciada macro e microscopicamente (dados não demonstrada anteriormente).

Contudo, os resultados obtidos por citometria de fluxo na análise do sangue periférico de camundongos tratados com 4NQO e diagnosticados com CCEB sugerem a possibilidade de que o processo metastático possa ser regulado por iNOS/NO. Tais dados devem ser encarados com cautela, visto ao fato de que não existem protocolos bem estabelecidos para esse tipo análise. Muitos marcadores já foram designados como específicos às células neoplásicas como CK-19, CK-AE1/AE3, EPCAM, e-Caderina. Contudo, sua presença também tem sido observada em leucócitos circulantes, dificultando uma análise mais definitiva dos resultados. Outros fatores que mereceria ser discutidos nesta avaliação: desconhecimento das características dos SCC e FSC comumente encontrados em células tumorais circundantes que seriam excluídas durante a análise inadvertidas, e o pequeno número de células tumorais circulantes usualmente relatadas em outros experimentos similares (GRÖBE *et al.*, em 2013; ABNOVA, 2014). Como nosso trabalho inaugura esta informação na literatura para animais tratados com 4NQO, mais estudos são necessários no sentido de aprofundar este conhecimento no modelo.

Embora alguns trabalhos experimentais reportem até 15-20 células tumorais circundantes por mL de sangue, a grande maioria destes estudos reportam dados similares aos nossos, os quais apresentaram apenas uns poucos eventos CD45⁺/CK-19⁻ por mL de sangue. Gröbe *et al.*, em 2013 analisaram amostras de sangue periférico de 80 pacientes com CCEB e detectaram células tumorais circulantes em 10 destes (12,5%), cujo número de células variou entre 1 e 14 por 7,5 mL de sangue (média: 3,2 CTCs/7,5 mL). Em outro trabalho, foram identificadas oito células tumorais circulantes por mL de sangue periférico de pacientes com CCEB (ABNOVA, 2014). Levando em consideração que em nosso ensaio trabalhamos, com um volume máximo de 0,5 mL, o um número de células circulantes, por nós encontrados embora pequeno, situa-se no intervalo dos resultados mencionados. Desta forma, acreditamos ser fundamental considerar o modelo de indução neoplásica por 4NQO como potencial ambiente para o estudo do fenômeno metastático e, por consequência, de abordagens terapêuticas para seu controle.

O papel da enzima iNOS, na biologia do tumoral humana, tem despertado a curiosidade de cientistas desde a década de 90, mesmo assim tal fenômeno é ainda mal compreendido. O crescimento de tumores sólidos é regulado por interações de células mesenquimais, de células endoteliais de vasos tumorais, e células do sistema imunológico que se infiltram no tumor, tais como os linfócitos T e macrófagos, e as próprias células tumorais. Já foi demonstrado em uma ampla variedade de trabalhos que todos estes componentes celulares podem gerar NO *in vitro* e *in vivo* (FORRESTER *et al.*, 1996). Nesta mesma

perspectiva, trabalhos em animais *knockout* condicionais ainda devem ser realizadas para identificar qual desses tipos celulares é mais importante para a função de iNOS/NO na carcinogênese.

A carcinogênese é um processo de várias etapas que requer uma sequência ainda incerta de alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas, as quais produzem mudanças em vias de sinalização intracelulares. Um grande número de atividades mediadas por iNOS/NO pode contribuir na tumorigênese incluindo a indução de dano celular, aumento da angiogênese modulada por VEGF, redução da apoptose, supressão do sistema imune e mutação do gene p53 (AMBS *et al.*, 1998; AMBS *et al.*, 1999; JAISWAL *et al.*, 2001; MUNTANÉ, LA MATA, 2010; ZIOBER *et al.*, 2006; HUSSAIN, HARRIS, 2007). Na verdade, iNOS pode modular cada uma das alterações das atividades celulares que são distintivas e específicas às células neoplásicas, de forma independente ou em associação com outras vias de sinalização. (FORRESTER *et al.*, 1996; HANAHAN, WEINBERG, 2000; HANAHAN, WEINBERG, 2011; ISAAC *et al.*, 2012; CHOUDHARI *et al.*, 2013; KORDE CHOUDHARI *et al.*, 2013).

Em seu trabalho maestral, Hanahan e Weinberg, em 2000 e 2011 descreveram várias características fundamentais às células neoplásicas: manutenção da sinalização proliferativa, inativação de genes supressores do crescimento, resistência aumentada a morte celular, longevidade replicativa, indução da angiogênese, ativação de vias de invasão e metástase, instabilidade do genética, indução constante de inflamação crônica, metabolismo energético alterado e capacidade de evadir a destruição imune (HANAHAN, WEINBERG, 2000; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Não faltam trabalhos na literatura que de forma individual, demonstram que a sinalização de iNOS e NO podem regular e alterar profundamente todos os processos listados acima, tanto em células normais, quanto em células neoplásicas (AMBS *et al.*, 1998; AMBS *et al.*, 1999; JAISWAL *et al.*, 2001; MUNTANÉ, LA MATA, 2010; ZIOBER *et al.*, 2006; HUSSAIN, HARRIS, 2007). Assim, é fundamental que se direcione o estudo para a participação de iNOS e NO na carcinogênese bucal para ampliar o entendimento dos mecanismos que determinam seu aparecimento e progressão.

Por serem doenças fortemente associada a fatores causais como o tabagismo e etilismo, as LB e o CCEB apresentam grande variação na sua incidência. Este fato encontra explicação no padrão de manifestação de cada lesão e, portanto, no seu diagnóstico, uma vez que cada grupo populacional apresenta diferentes experiências de exposição a fatores carcinogênicos (HOLMSTRUP *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; ARIYAWARDANA *et al.*, 2007; LAPTHANASUPKUL *et al.*, 2007; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2011; WARNAKULASURIYA, ARIYAWARDANA, 2016).

MERIC *et al.* (2012) e KARTHIK *et al.* (2014) mostraram por técnica imuno-histoquímica que iNOS estava significativamente aumentada em mucosa bucal de pacientes fumantes. Dessa forma, tais dados sugerem um efeito primário ou secundário da exposição ao fumo sobre a modulação desta proteína. Compostos químicos cancerígenos do tabaco apresentam capacidade de induzir a produção de NO e a super-expressão de iNOS, de forma bastante similar aos modelos experimentais que utilizam DMBA e/ou 4NQO como fatores carcinogênicos. Estes dados suportam a tese de que iNOS participe direta ou indiretamente nas fases mais precoces do processo.

O primeiro estudo que identificou a presença de iNOS em amostras de CCEB humano foi realizado por Rosbe *et al.*, em 1995. Neste trabalho, os autores sugeriram que a enzima iNOS poderia desempenhar um papel significativo no crescimento tumoral. Vários estudos subsequentes relataram expressão significativamente maior de iNOS ou altos níveis salivares e plasmáticos de iNOS ou NO em paciente com CCEB. A maior parte destes estudos demonstrou também um aumento na expressão de iNOS durante a progressão da carcinogênese a partir da avaliação da mucosa normal, passando pelos vários estágios displásicos até a expressão clínica do carcinoma (CHEN *et al.*, 2002a,b, c, d; BRENNAN *et al.*, 2000).

O trabalho de Chen *et al.*, 2002, confirma nossos resultados sobre a expressão genica de *NOS2* em amostras de tecido humanos. Dessa forma, fica claro que existe um aumento na transcrição do gene *NOS2* durante a carcinogênese oral humana. De maneira muito semelhante aos nossos resultados, vários autores têm relatado alterações nos níveis de iNOS em amostras de LB e CCEB (CHEN *et al.* 2002, RAJENDRAN, SHIRLEY, 2007, BRENNAN *et al.*, 2008; VARGHESE, *et al.*, 2010; MASTRANGELO, *et al.*, 2014; HSIEH *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015). Estes autores têm relatado, repetindo o que já foi observado para outros tipos de carcinogênese humana e nos modelos de carcinogênese experimental bucal, que iNOS aumenta progressivamente da mucosa normal para o CCEB, mantendo-se em níveis intermediários nas lesões cancerizáveis traduzidas pelos diferentes tipos de displasias epiteliais.

Além do papel de iNOS/NO na progressão da mucosa normal, para as LB e até o CCEB, outros autores também corroboram nossos achados de que iNOS/NO também parece ser envolvida na modulação do processo metastático nos CCEB. Esta conclusão tem sido baseada no fato de que níveis elevados de iNOS tem sido mostrado significativamente relacionado ao estadiamento e com a presença de metástases regionais (CHEN *et al.*, 2002; CONNELLY *et al.*, 2005; BRENNAN *et al.*, 2008; SAPPAYATOSOK *et al.*, 2009 e YANG

et al. 2015). Novamente, como iNOS/NO podem modular processos tais como: a malignização das LB, o crescimento e as metástases dos CCEB, parece claro que tal marcador é uma boa ferramenta para discriminar CCEB metastáticos dos não metastáticos, viabilizando investigações sobre sua utilização como marcador de prognóstico, incluindo sobrevida dos pacientes (YANG *et al.*, 2015).

Há uma aparente ausência de estudos avaliando a modificação pós-traducional nitrotirosina na carcinogênese bucal, dificultando uma discussão mais ampla neste momento. Nossos resultados mostraram que a presença de nitrotirosina identificada pela técnica imuno-histoquímica correlaciona-se positivamente com iNOS. Dessa forma, a nitrificação dos resíduos de aminoácido de tirosina parece ser um dos mecanismos de ação do NO produzido pela iNOS. Tais alterações podem levar a ganhos e perdas das funções proteicas, que ainda não foram mapeadas e vão muito além do escopo deste trabalho. Tem sido mostrado na literatura a importância da nitrificação proteica para a progressão do CCEB e para a manutenção do fenótipo resistente a radio-quimioterapia (KALIYAPERUMAL *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostraram que nitrotirosina apresentou um padrão semiquantitativo de expressão bastante similar ao de iNOS, traduzido pelo aumento da imuno-marcação de nitrotirosina em amostras de CCEB quando comparados a LB e a mucosa normal. Tal fato, pode representar que os aumentos de tais nitrificações são importantes, senão responsáveis, pelas desregulações vistas em várias proteínas citoplasmáticas e em várias vias de sinalizações, as quais são associadas ao fenótipo celular maligno. Nossos dados demonstram que alta imuno-marcação de nitrotirosina pode segregar casos de CCEB em metastáticos e não metastáticos, bem como pode prever quais pacientes apresentaram maior risco de mortalidade. Estes resultados preliminares devem ser seguidos de outras investigações que permitam não só entender o significado da nitrificação proteica na carcinogênese, como também avaliar se este fenômeno representa um marcador de prognóstico.

Outros resultados também ilustram o potencial envolvimento do NO e de outras e enzimas antioxidantes em patogênese do câncer oral. Diferentes autores também encontraram super-expressão das enzimas eNOS e nNOS em LB e CCEB, sugerindo que outras enzimas produtoras de NO podem ter papel significativo na carcinogênese oral (CHENG, *et al.*, 2002a/b/c/d; PATEL *et al.*, 2009; YANG *et al.* 2015). Mais estudos são necessários para avaliar o papel exato de todas estas enzimas produtoras de NO, no desenvolvimento e progressão do câncer oral. De fato, todas as isoformas de NOS foram detectadas super-expressas em vários tipos de tumores malignos humanos além dos CCEB, por exemplo tumores de mama, câncer do colo do útero, câncer do pulmão, carcinoma gástrico, neoplasias

do cólon, e em tumores associados com o sistema nervoso central (AMBS *et al.*, 1998; AMBS *et al.*, 1999; JAISWAL *et al.*, 2001; MUNTANÉ, LA MATA, 2010; ZIOBER *et al.*, 2006; HUSSAIN & HARRIS, 2007).

Os dados discutidos acima, em associação com os nossos resultados, suportam a hipótese de que iNOS desempenha um importante papel no desenvolvimento das lesões displásicas e neoplásicas no epitélio bucal humano e de camundongos. Uma vez que o papel de iNOS e de NO nas neoplasias malignas é multidimensional e ainda mal descrito, a compreensão de suas funções irá abrir novas dimensões no diagnóstico, na terapia e no acompanhamento de lesões cancerizáveis e bem como de pacientes com CCEB.

6.0. CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos nesta avaliação é possível concluir que a enzima iNOS apresenta um papel importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal humano tanto nas lesões obtidas através da indução experimental em modelo murino de carcinogênese lingual, quanto nas amostras das lesões humanas

De forma específica, os dados aqui apresentados nos permitem concluir que:

1.0. O volume hídrico consumido semanalmente varia bastante entre os grupos experimental e controle, embora não exista diferenças entre o consumo dos grupos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}. O processo de carcinogênese experimental pela exposição ao 4NQO é tóxico para os animais, produzindo lesões displásicas e neoplásicas na língua, e alterações de peso ponderal e hepático.

2.0. Não existem grandes variações da análise macroscópica das lesões em superfície lingual dos camundongos *iNOS*^{+/+} e *iNOS*^{-/-}, tratados com 4NQO.

3.0. A presença significativamente menor de tumores em animais *knockout* para *iNOS* demonstra que iNOS está envolvida na modulação de fenômenos vinculados a carcinogênese no modelo de carcinogênese lingual experimental;

4.0. Embora de maneira exploratória, nota-se células tumorais circulantes apenas nos animais *iNOS*^{+/+}.

5.0. iNOS modula os fenômenos da carcinogênese e da progressão neoplásica do carcinoma de células escamosas bucais em humano.

6.0 O fenômeno de nitrificação proteica, dado pela imuno-marcação de nitrotirosina em casos de leucoplasias bucais e carcinomas, reforça a tese da participação de fenômenos oxidativos na carcinogênese humana.

7.0. Existe uma clara correlação entre a imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina nos grupos estudados.

8.0. Uma alta imuno-marcação de nitrotirosina está relacionada com aumento do risco do evento morte em pacientes com carcinoma de células escamosas bucal.

9.0. A avaliação da imuno-marcação de iNOS e nitrotirosina pelo método imuno-histoquímico apresenta potencial valor como marcador de comportamento tumoral e prognóstico traduzido na sua relação com dimensão, presença de metástases, estadiamento e recidiva das lesões.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, SEGUNDO NORMAS
VIGENTES DA ABNT**

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, SEGUNDO NORMAS VIGENTES DA ABNT

ABNOVA. Application Note: Circulating Tumor Cells as Metastatic Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma, 2014.

ACHARYA, S.; SIVAKUMAR, A.T.; SHETTY, S. Cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a correlative study between histopathological malignancy grading and lymph node metastasis. **Indian Journal of Dental Research**, v. 24, n. 5, p. 599-604, 2013.

AHN, B.; HAN, B.S.; KIM, D.J.; OHSHIMA, H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by Nnitrosodiethylamine. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 10, p. 1337-1344, 1999.

AMBS, S.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; BENNETT, W.P.; ISHIBE, N.; HUSSAIN, S.P.; TZENG, E.E.; GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R.; e HARRIS, C.C. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. **Nature Medicine**, v.4, n.12, p.1371-1376, 1998b.

AMBS, S.; BENNETT, W.P.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; OSER, S.M.; HARRINGTON, A.M.; SHIELDS, P.G.; FELLE-Y-BOSCO, E.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. **Journal National Cancer Institute**, v. 91, n. 1, p. 86-88, 1999.

AMBS, S.; BENNETT, W.P.; MERRIAM, W.G.; OGUNFUSIKA, M.O.; OSER, S.M.; KHAN, M.A.; JONES, R.T.; HARRIS, C.C. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. **The British Journal of Cancer**, v. 78, n. 2, p. 233-239, 1998.

ANDERSEN, P.E.; WARREN, F.; SPIRO, J.; BURNINGHAM, A.; WONG, R.; WAX, M.K.; et al. Results of selective neck dissection in management of the node-positive neck. **Archives of Otolaryngology and Head Neck Surgery**, v. 128, n. 10, p. 1180-1184, 2002.

ANNEROTH, G.; HANSEN, L.S.; SILVERMAN, S.J.R. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, n. 3, p. 162-168, 1986.

ANDL, T.; KAHN, T.; PFUHL, A.; NICOLA, T.; ERBER, R.; CONRADT, C.; KLEIN, W.; HELBIG, M.; DIETZ, A.; WEIDAUER, H.; BOSCH, F.X. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. **Cancer Research**, v. 58, n. 1, p. 5-13, 1998.

- ARDUINO, P.G.; BAGAN, J.; EL-NAGGAR, A.K.; CARROZZO, M. Urban legends series: oral leukoplakia. **Oral Diseases**, v. 19, n. 7, p. 642-659, 2013.
- ARIYAWARDANA, A.; SITHEEQUE, M.A.M.; RANASINGHE, A.W.; PERERA, I.; TILAKARATNE, W.M.; AMARATUNGA, E.; et al. Prevalence of oral câncer and pre-cancer and associated risk factors among tea estate workers in the central Sri Lanka. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 36, n. 6, 581-587, 2007.
- BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010.
- BALARAM, P.; SRIDHAR, H.; RAJKUMAR, T.; VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; NANDAKUMAR, A.; RAVICHANDRAN, K.; RAMDAS, K.; SANKARANARAYANAN, R.; GAJALAKSHMI, V.; MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. **International Journal of Cancer**, v. 98, n. 1, p. 440-445, 2002.
- BANDRES, E.; CUBEDO, E.; X. AGIRRE, R.; MALUMBRES, R.; ZARATE, N.; RAMIREZ, A.; ABAJO, A.; NAVARRO, I.; MORENO, M.; MONZO J.; GARCIA-FONCILLAS R. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. **Molecular Cancer**, v.5, p.29-. 2006.
- BANOCZY, J.C.; SIBA, A. Occurence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 42, n. 8, p. 766-774, 1976.
- BAUMAN, J.E.; ZANG, Y.; SEN, M.; LI, C.; WANG, L.; EGNER, P.A.; FAHEY, J.W.; NORMOLLE, D.P.; GRANDIS, J.R.; KENSLER, T.W.; JOHNSON, D.E. Prevention of Carcinogen-Induced Oral Cancer by Sulforaphane. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 7, p. 547-557, 2016.
- BARCESSAT, A.R.; HUANG, I.; RABELO, G.D.; ROSIN, F.C.; FERREIRA, L.G.; DE CERQUEIRA LUZ, J.G.; CORRÊA, L. Systemic toxic effects during early phases of topical 4-NQO-induced oral carcinogenesis in rats. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, n. 10, p. 770-777, 2014.
- BIER, J. Radical neck dissection versus conservative neck dissection for squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Recent Results in Cancer Research**, v. 134, n. 1, p. 57-62, 1994.
- BLOCK, K.; GORIN, Y. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. **Nature Review Cancer**, v. 12, n. 6, p. 627-637, 2012.
- BOOTH, E.D.; ASTON, J.P.; VAN DEN BERG, P.T.; BAAN, R.A.; RIDDICK, D.A.; WADE, L.T.; WRIGHT, A.S.; WATSON, W.P. Class-specific immunoabsorption purification for

- polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2099-2106, 1994.
- BOURHIS, J.; AMAND, C.; PIGNON, J.P. Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head & Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy: 5505. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n.14S, 2004.
- BREDT, D. S., HWANG P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v.347, n.6295, p.768-770. 1990.
- BRENNAN, J.A.; BOYLE, J.O.; KOCH, W.M.; GOODMAN, S.N.; HRUBAN, R.H.; EBY, Y.J.; COUCH, M.J.; FORASTIERE, A.A.; SIDRANSKY, D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamouscell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 7, p. 712-717, 1995.
- BRENNAN, P.A. Expression of inducible nitric oxide synthase and p53 in oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.90, n. 7, p. 624-629, 2000.
- BRENNAN, P.A.; PALACIOS-CALLENDER, M.; ZAKI, G.A.; SPEDDING, A.V.; LANGDON, J.D. Type II nitric oxide synthase (NOS2) expression correlates with lymph node status in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 30, n. 2, p. 129-134, 2001.
- BRENNAN, J.A.; DENNIS, S.; POLLER, D.; QUINTERO, M.; PUXEDDU R.; THOMAS G. J. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v.30, n.2, p.208-214. 2008.
- BUSTIN, S.A. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 217-226, 2010.
- CALVISI, D. F., PINNA, F.; LADU, S.; PELLEGRINO, R.; MURONI, M. R.; SIMILE, M. M.; FRAU, M.; TOMASI, M. L.; DE MIGLIO, M. R.; SEDDAIU, M. A.; DAINO, L.; SANNA, V.; FEO F.; PASCALE, R. M. Aberrant iNOS signaling is under genetic control in rodent liver cancer and potentially prognostic for the human disease. **Carcinogenesis**, v.29, n.8, p.1639-1647. 2008.
- CALVISI, D. F.; PASCALE, R. M.; FEO, F. Dissection of signal transduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v.2, n.3, p.217-236. 2007.

- Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative. Concomitant chemotherapy and radiotherapy in squamous cell head and neck cancer (excluding nasopharynx). 2000. [cited 11 August 2006]. Available from url: http://www.cancercare.on.ca/pdf/sumry5_6c.pdf
- CASTELLANI, A. Epidemiology and Quantitation of Environmental Risk in Humans from Radiation and Other Agents. Nato ASI Subseries A, 1985.
- CHAITANYA, N.C.; ALLAM, N.S.; GANDHI-BABU, D.B.; WAGHRAY, S.; BADAM, R.K.; LAVANYA, R. Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer. **Journal of Cancer Research and Therapy**, v. 12, n. 2, p. 969-974, 2016.
- CHAN, S.W.; READE, P.C. The role of ascorbic acid in oral cancer and carcinogenesis. *Oral Diseases*, v. 4, n. 2, p. 120-129, 1998.
- CHANG, K.W.; SARRAJ, S.; LIN, S.C.; TSAI, P.I.; SOLT, D. P53 expression, p53 and Ha-ras mutation and telomerase activation during nitrosamine-mediated hamster pouch carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 7, p. 1441-1451, 2000.
- CHEN, Y.K.; HUSE S.S.; LIN, L.M. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 36, n. 2, p. 221-224, 2000.
- CHEN, Y.K.; HUSE S.S.; LIN, L.M. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human buccal squamous-cell carcinomas: immunohistochemical, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR studies. **Head Neck**, v. 24, n. 7, p.925-932, 2002a.
- CHEN, Y.K.; HUSE S.S.; LIN, L.M. Expression of inducible nitric oxide synthase in human oral premalignant epithelial lesions. **Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 4, p. 387-392, 2002b.
- CHEN, Y.K.; HUSE S.S.; LIN, L.M. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human oral submucous fibrosis, verrucous hyperplasia, and verrucous carcinoma. **Internation Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.31, n. 5, p. 419-422, 2002c.
- CHEN, Y.K.; HAUE, S.S.; LIN, L.M. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA induced hamster buccal pouch carcinomas using reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 31, n. 2, p. 8286, 2002d.
- CHEN, Y.K.; HSUE, S.S.; LIN, L.M. Correlation between inducible nitric oxide synthase and p53 expression for DMBA-induced hamster buccal-pouch carcinomas. **Oral Diseases**, v. 9, n. 5, p. 227-234, 2003.
- CHEN, Y.K.; HUSE S.S.; LIN, L.M. Inhibitory effect of inducible nitric oxide synthase inhibitors on DMBA-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis. **Nitric Oxide**, v.13, n.4, p.232-239. 2005.

- CHEN, W.L.; YANG, L.; ZENG S.G.; WANG, Y.J. Effect of using RNA interference to alter iNOS gene expression on the proliferation of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113. **The British journal of oral & maxillofacial surgery**, v.46, n.6, p.435-438. 2008.
- CHEPEHA, D.B.; HOFF, P.T.; TAYLOR, R.J.; BRADFORD, C.R.; TEKNOS, T.N.; ESCLAMADO, R.M. Selective neck dissection for the treatment of neck metastasis from squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope**, v. 112, n. 3, p. 434-438, 2002.
- CHOUDHARI, S.K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A.R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 30, n.2, p. 118, 2013.
- CHU, W.; STRAWITZ, J.G. Results in suprahyoid, modified radical, and standard radical neck dissections for metastatic squamous cell carcinoma: recurrence and survival. **American Journal of Surgery**, v. 136, n. 4, p. 512-515, 1978.
- CONNELLY, S.T.; MACABEO-ONG, M.; DEKKER, N.; JORDAN, R.C.K.; SCHMIDT, B.L. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.41, n.3, p.261-267, 2005.
- CULLIS, E.R.; KALBER, T.L.; ASHTON, S.E.; CARTWRIGHT, J.E.; GRIFFITHS, J.R.; RYAN, A.J.; ROBINSON, S.P. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. **Microvascular Research**, v. 71, n. 2, p. 76-84, 2006.
- DANTAS, T.S.; DE BARROS SILVA, P.G.; SOUSA, E.F.; DA CUNHA, M.D.O. P.; DE AGUIAR, A.S.; COSTA, F.W.; MOTA, M.R.; ALVES, A.P.; SOUSA, F.B. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. **Medicine**, v. 95, n. 3, p. e2314, 2016.
- DAVIDSON, B.J.; KULKARNY, V.; DELACURE, M.D.; SHAH, J.P. Posterior triangle metastases of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. **American Journal of Surgery**, v. 166, n.4, p. 395-398, 1993.
- DAVIES, M.; PATERSON, I.C.; STONE, A.; HUNTLEY, S.; PATEL, V.; CURTIS, R.; MATTHEWS, J.B.; PRING, M.; EVESON, J.W.; PRIME, S.S. Loss of differentiation of 4NQO induced rat malignant oral keratinocytes correlates with metastatic dissemination and is associated with a reduced cellular response to TGF α 1 and an altered receptor profile. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 397-405, 1999.
- DAYAN, D.; HIRSHBERG, A.; KAPLAN, I.; ROTEM, N.; BODNER, L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncology**, v. 33, n. 2, p. 105-109, 1997.

- DETRE, S.; SACLANI JOTTI, G.; DOWSETT, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 6, p. 876–878, 1995.
- DE SOUZA, M.V.; SERVATO, J.P.; LOYOLA, A.M.; CARDOSO, S.V.; CHAMMAS, R.; LIU, F.T.; SILVA, M.J.; DE FARIA, P.R. Expression of APC protein during tongue malignant transformation in galectin-3-deficient mice challenged by the carcinogen 4-nitroquinoline-n-oxide. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 6, p. 3255-3263, 2014.
- DE OLIVEIRA SANTOS, D.; LOYOLA, A.M.; CARDOSO, S.V.; CHAMMAS, R.; LIU, F.T.; DE FARIA, P.R. Hedgehog signaling pathway mediates tongue tumorigenesis in wild-type mice but not in Gal3-deficient mice. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 97, n. 3, p.332-327, 2014.
- DIONNE, K.R.; WARNAKULASURIYA, S.; ZAIN, R.B.; CHEONG, S.C. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. 503-515, 2014.
- DU, J.R.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.M.; FU, H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 1604-1606, 2003.
- EDWARDS, D.M.; JOHNSON, N.W. Treatment of upper aerodigestive tract cancers in England and its effect on survival. **British Journal of Cancer**, v.81, n. 2, p. 323-329, 1999.
- EL NAGGAR, A.K.; REICHART, P.A. Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). Lyon, I.A.R.C. Press., p. 180-181, 2005.
- ELOUIL, H.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L.; HENQUIN, J. C.; JONAS, J. C. High glucose and hydrogen peroxide increase c-Myc and haeme-oxygenase 1 mRNA levels in rat pancreatic islets without activating NFkappaB. **Diabetologia**, v.48, n.3, p.496-505. 2005.
- FARIA, P.R.; CHAMMAS, R.; MELO, T.L.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; NONOGAKI, S.; CARDOSO, S.V.; LOYOLA, A.M. Absence of galectin-3 does not affect the development of experimental tongue carcinomas in mice. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 90, p. 189–193, 2011.
- FENG, C.W.; WANG, L.D.; JIAO, L.H.; LIU, B.; ZHENG, S.; XIE, X.J. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. **BMC Cancer**, v. 29, n. 2, p. 8, 2002.

- FEO, F.; FRAU, M.; PASCALE, R.M. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. **World Journal Gastroenterology**, v.14, n.43, p.6601-6615. 2008.
- FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, p. 669-676, 2007.
- FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER D.; HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, v.339, n.6219, p.58-61. 1989.
- FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S.E.; KAPUST, R.B.; SPILLARE, E.A.; WEINBERG, W.C.; FELLE-Y-BOSCO, E.; WANG, X.W.; GELLER, D.A.; TZENG, E.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2442-2447, 2000.
- FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Review Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521-534, 2006.
- GALE, N.; PILCH, B.Z.; SIDRANSKY, D.; et al. Epithelial precursor lesions. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). Lyon, I.A.R.C. Press., p. 177-179, 2005.
- GAO, T.; JOYCE, B.T.; LIU, L.; ZHENG, Y.; DAI, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, W.; SHRUBSOLE, M.J.; TAO, M.H.; SCHWARTZ, J.; BACCARELLI, A.; HOU, L. DNA methylation of oxidative stress genes and cancer risk in the Normative Aging Study. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 553-61, 2016.
- GILLISON, M.L.; KOCH, W.M.; CAPONE, R.B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W.H.; WU, L.; ZAHURAK, M.L.; DANIEL, R.W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D.E.; SHAH, K.V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal do National Cancer Institute**, v. 92, n. 7, p.709-720, 2000.
- GILLISON, M.L.; KOCH, W.M.; CAPONE, R.B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W.H.; WU, L.; ZAHURAK GREENE, F.L.; PAGE, D.L.; FLEMING, I.D.; FRITZ, A.G.; BALCH, C.M.; HALLER, D.G.; MORROW, M. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual. Springer: New York, 2002.
- GRÖBE, A.; BLESSMANN, M.; HANKEN, H.; FRIEDRICH, R.E.; SCHÖN, G.; WIKNER, J.; EFFENBERGER, K.E.; KLUWE, L.; HEILAND, M.; PANTEL, K.; RIETHDORF, S. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone

marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 2, p. 425-433, 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASHIM, D.; SARTORI, S.; BRENNAN, P.; et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **Annals of Oncology**, v. 27, n.8, p. 1619-1625, 2016.

HAWKINS, B.L.; HENIFORD, B.W.; ACKERMANN, D.M.; LEONBERGER, M.; MARTINEZ, S.A.; HENDLER, F.J. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 16, n. 5, p. 424-432, 1994.

HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S.; ICHINOSE, T.; MURATA, M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. **Annals of New York Academy of Science**, v. 1203, n. 1, p. 15-22, 2010.

HO, Q.T.; CUO, C.J. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutics application. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1349-1357, 2007.

HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Long term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 42, n. 3, p. 461-474, 2006.

HSIEH, M.J.; LIN, C.W.; CHIOU, H.L.; YANG, S.F.; CHEN, M.K. Dehydroandrographolide, an iNOS inhibitor, extracted from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, induce autophagy in human oral cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 30831-30849, 2016.

HUSSAIN, S. P.; C. C. HARRIS. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. **International Journal of Cancer**, v.121, n.11, p.2373-2380, 2007.

HUSSAIN, S.P; HARRIS, C.C. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **Journal Nippon Medical School**, v. 73, n.2, p. 54-64, 2006.

ICHINOE, M.; MIKAMI, T.; SHIRAISHI, H.; OKAYASU, I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. **Histopathology**, v. 46, n. 6, p. 612-618, 2004.

IDE, F.; KITADA, M.; SAKASHITA, H.; KUSAMA, K.; TANAKA, K.; ISHIKAWA, T. p53 haploinsufficiency profoundly accelerates the onset of tongue tumors in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 5, p. 1729-1733, 2003.

IDE, F.; ODA, H.; NAKATSURU, Y.; KUSAMA, K.; SAKASHITA, H.; TANAKA, K.; ISHIKAWA, T. Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 567-572, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, p. 40-41, 2015.

ISAAC, J.; TARAPORE, P.; ZHANG, X.; LAM, Y.W.; HO, S.M. Site-specific S-nitrosylation of integrin $\alpha 6$ increases the extent of prostate cancer cell migration by enhancing integrin $\beta 1$ association and weakening adherence to laminin-1. **Biochemistry**, v. 51, n. 48, p. 9689-9697, 2012.

JAISWAL, M.; LARUSSO, N.F.; GORES, G.J. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**, v.281, n. 6, p. G626-G634, 2001.

JAMADAR, S.; NARAYAN, T.V.; SHREEDHAR, B.; MOHANTY, L.; SHENOY, S. Comparative study of various grading systems in oral squamous cell carcinoma and their value in predicting lymph node metastasis. **Indian Journal of Dental Research**, v. 25, n. 3, p. 357-363, 2014.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, L.L.; MOSS, D.W.; HOLMES, L.S.; BAYLIS, S.A.; RHODES, P.; WESTMORE, K.; EMSON, P.C.; MONCADA, S. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4392-4396, 1995.

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J. et al., Squamous cell carcinoma. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). Lyon, I.A.R.C. Press., p. 168-175, 2005.

KALIYAPERUMAL, K.; SHARMA, A.K.; MCDONALD, D.G.; DHINDSA, J.S.; YOUNT, C.; SINGH, A.K.; WON, J.S.; SINGH, I. S-Nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma. **Redox Biology**, v. 6, n. 1, p. 41-50, 201.

KANDARKAR, S.V.; SAWANT, S.S.; READE, P.C. Ultrastructural changes to the palatal mucosa of rats following the application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) and vitamin C. **Oral Oncology**, v. 34, n. 4, p. 247-252, 1998.

- KANOJIA, D.; VAIDYA, M.M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 42, n. 7, p. 665-67, 2006.
- KAPLAN, I.; ENGELBERG, J.; DAYAN, D. The effect of desalivation on 4 nitroquinoline-1-oxide induced tongue carcinogenesis: a morphological study of nuclear organizer regions. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 30, n. 1, p. 48-52, 2001.
- KARTHIK, B.; SHRUTHI, D.K.; SINGH, J.; TEGGINAMANI, A.S.; KUDVA, S. Do tobacco stimulate the production of nitric oxide by up regulation of inducible nitric oxide synthesis in cancer: Immunohistochemical determination of inducible nitric oxide synthesis in oral squamous cell carcinoma--a comparative study in tobacco habitués and non-habitués. **Journal of Cancer Research and Therapy**, v. 10, n. 2, p. 244-250, 2014.
- KAUR, G.; ATHAR, M.; ALAM, M.S. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n.2, p. 290-301, 2010.
- KIRITA, T.; OKABE, S.; IZUMO, T.; SUGIMURA, M. Risk factors for the postoperative local recurrence of tongue carcinoma. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, n. 52, v. 2, p.149-154, 1994.
- KOCH, W.M.; LANGO, M.; SEWELL, D.; ZAHURAK, M.; SIDRANSKY, D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope**, v. 109, n. 10, p. 1544-1551, 1999.
- KORDE CHOUDHARI, S.; SRIDHARAN, G.; GADBAIL, A.; POORNIMA, V. Nitric oxide and oral cancer: a review. **Oral Oncology**, v. 48, n. 4, p.475-483, 2012.
- KUJAN, O.; KHATTAB, A.; OLIVER, R.J.; ROBERTS, S.A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**, v. 43, n. 3, p. 224-231, 2007.
- KUJAN, O.; OLIVER, R.J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S.A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v.42, n. 8, p. 987-993, 2006.
- LACROIX, M.; TOILLON, R-A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocrine-related Cancer**, v. 13, p. 293-325, 2006.
- LAPTHANASUPKUL, P.; POOMSAWAT, S.; PUNYASINGH, J. A clinic pathologic study of oral leukoplakia and erythroplakia in a Thai population. **Quintessence International**, v. 38, n. 3, p. 448-455, 2007.
- LARAMORE, G.E.; SCOTT, C.B.; AL SARRAF, M.; HASELOW, R.E.; ERVIN, T.J.; WHEELER, R.; JACOBS, J.R.; SCHULLER, D.E.; GAHBAUER, R.A.; SCHWADE, J.G.;

- CAMPBELL, B.H. Adjuvant chemotherapy for resectable squamous cell carcinomas of the head and neck: report on Intergroup Study 0034. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v, 23, n. 8, p. 705-713, 1992.
- LAVERTU, P.; BONAFEDE, J.P.; ADELSTEIN, D.J.; SAXTON, J.P.; STROME, M.; WANAMAKER, J.R. et al. Comparison of surgical complications after organ-preservation therapy in patients with stage III or IV squamous cell head and neck cancer. **Archives of Otolaryngology – Head Neck Surgery**, v.124, n. 4, p. 401-406, 1998.
- LAZZARO, B.; CLEVELAND, D. P53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 98, n. 5, p. 613-617, 2000.
- LEE, J.J.; HUNG, H.C.; CHENG, S.J.; CHEN, Y.J.; CHIANG, C.P.; LIU, B.Y. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakia in Taiwan: Prevalence and risk factors. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 101, n. 5, p. 472-480, 2006.
- LEEMANS, C.R.; BRAAKHUIS, B.J.; BRAKENHOFF, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews of Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.
- LEONARD, N.; BISHOP, A.E.; POLAK, J.M.; TALBOT, I.C. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. **Journal Clinical Pathology**, v.51, n.10, p.750-753, 1998.
- LI, J.; LIANG, F.; YU, D.; QING, H.; YANG, Y. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, n. 4, p.299-305, 2013.
- LIN, J.K.; PAN, M.H.; LIN-SHIAU, S.Y. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. **Biofactors**, v.13, n.1-4, p.153-158, 2000.
- LLEWELLYN, C.D.; LINKLATER, K.; BELL, J.; JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, K.A. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncology**, v. 39, n.1, p. 106-114, 2003.
- LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 79, n. 3, p. 321-329, 1995.
- MAEDA, K.; CHUNG, Y.S.; OGAWA, Y.; TAKATSUKA, S.; KANG, S.M.; OGAWA, M.; SAWADA, T.; SOWA, M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 858-863, 1996.

- MAHARAJ, A.S.R.; SAINT-GENIEZ, M.; MALDONADO, A.E.; D'AMORE, P.A. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n.5, p. 639-648, 2006.
- MARCHIONI, D.L.; FISBERG, R.M.; DO ROSARIO, M.; LATORRE, D.O.; WUNSCH, V. Diet and cancer of oral cavity and pharynx: a case-control study in Sao Paulo, Brazil. IARC Science Publisher, v. 156, n.1, p. 559-561, 2002.
- MASTRANGELO, F.; VINCI, R.; FALCO, G.; TETTAMANTI, L.; TETÈ, S.; TAGLIABUE, A.; GHERLONE, E. Nitric oxide synthase evaluation in oral precancerous and cancerous lesions. **Journal of Biological Regulation and Homeostatic Agents**, 28, n. 4, p. 767-773, 2014.
- MAZUREK, A.; KUC, P.; TERLIKOWSKI S.; LAUDANSKI, T. Evaluation of tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase tissue expression in patients with endometrial cancer. **Neoplasma**, v.53, n.3, p.242-6. 2006.
- MEDINI, E.; MEDINI, I.; LEE, C.K.; GAPANY, M.; LEVITT, S.H. Curative radiotherapy for stage II-III squamous cell carcinoma of the glottic larynx. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 3, p. 302-305, 1998.
- MEHANNA, H.; PALERI, V.; WEST, C.M.; NUTTING, C. Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. **BMJ**, v. 341, p. c4684, 2010.
- MENDENHALL, W.M.; AMDUR, R.J.; STRINGER, S.P.; VILLARET, D.B.; CASSISI, N.J. Radiation therapy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: a preferred alternative to surgery? **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 11, p. 2219-2225, 2000.
- MERIC, A.; OZUCER, B.; GEDIKLI, O.; YILDIRIM, Y.; KORKUT, A.Y.; KAHYA, V.; EREN, S.B.; SOMAY, A. Impact of smoking on p65 nuclear factor κ B, p38 mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase expression levels in oral mucosa. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 4, p. 970-973, 2012.
- MILLER, R.T.; KUBIER, P.; REYNOLDS, B.; HENRY, T.; TURNBOW, H. Blocking of endogenous avidin binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **AIMM**, v. 7, p. 63-65, 1999.
- MIRZAYANS, R.; BASHIR, S.; MURRAY, D.; PATERSON, M.C. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 6, p. 941-946, 1999.

- MITHANI, S.K.; MYDLARZ, W.K.; GRUMBINE, F.L.; SMITH, I.M.; CALIFANO, J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Diseases**, v. 13, n.2, p. 126-133, 2007.
- MOLINARI, R.; CANTU, G.; CHIESA, F.; GRANDI, C. Retrospective comparison of conservative and radical neck dissection in laryngeal cancer. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v. 89, n. 6, p. 578-581, 1980.
- MOZET, C.; MARIN, D.G.; BERTOLINI, J.; TANNAPFEL, A.; WICHMANN, G.; DIETZ, A. Nitric oxide synthase (NOS2/3) expression in head and neck squamous cell carcinomas in correlation with clinical patterns. **Onkologie**, v, 32, n. 11, p. 655-660, 2009.
- MUKHOPADHYAY, D.; TSIOKAS, L.; SUKHATME, V.P. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. **Cancer Research**, v.55, n. 24, p. 6161-6165, 1995.
- MUNTANÉ, J.; LA MATA, M.D. Nitric oxide and cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 2, n. 9, p. 337-344, 2010.
- MURATA, M.; THANAN, R.; MA, N.; KAWANISHI, S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 623019, 2012.
- NAUTA, J.M.; ROODENBURG, J.L.; NIKKELS, P.G.; WITJES, M.J.; VERMEY, A. Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 24, n. 1, p.53-58, 1995.
- NAWROZ, H.; KOCH, W.; ANKER, P.; STROUN, M.; SIDRANSKY, D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. **Nature Medicine**, v. 2, n. 9, p. 1035-1037, 1996.
- NISHIKAWA, M.; CHANG, B.; INOUE, M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 11, p. 2101-2105, 2004.
- NUNOSHIBA, T.; DEMPLE, B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4nitroquinolineNoxide. **Cancer Research**, v. 53, n. 14, p. 32503252, 1993.
- OGHUMU, S.; KNOBLOCH, T.J.; TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; AHN-JARVIS, J.; BOLLINGER, C.E.; IWENOFU, H.; WEGHORST, C.M.; SATOSKAR, A.R. Deletion of macrophage migration inhibitory factor inhibits murine oral carcinogenesis: Potential role for chronic pro-inflammatory immune mediators. **Internation Journal of Cancer**, v. 139, n. 6, p.1379-1390, 2016.

- ORUS, C.; LEON, X.; VEGA, M.; QUER, M. Initial treatment of the early stages (I, II) of supraglottic squamous cell carcinoma: partial laryngectomy versus radiotherapy. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 257, n. 9, p. 512-516, 2000.
- PAISLEY, S.; WARDE, P.R.; O'SULLIVAN, B.; WALDRON, J.; GULLANE, P.J.; PAYNE, D.; et al. Results of radiotherapy for primary subglottic squamous cell carcinoma. **International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics**, v. 52, n. 5, p. 1245-1250, 2002.
- PAPAEVANGELOU, E.; WHITLEY, G.S.; JOHNSTONE, A.P.; ROBINSON, S.P.; HOWE, F.A. Investigating the role of tumour cell derived iNOS on tumour growth and vasculature in vivo using a tetracycline regulated expression system. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 11, p. 2678-2687, 2016.
- PARTRIDGE, M.; LI, S.R.; PATEROMICHELAKIS, S.; FRANCIS, R.; PHILLIPS, E.; HUANG, X.H.; TESFA-SELASE, F.; LANGDON, J.D. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 2718-2725, 2000.
- PATEL, J.B.; SHAH, F.D.; SHUKLA, S.N.; SHAH, P.M.; PATEL, P.S. Role of nitric oxide and antioxidant enzymes in the pathogenesis of oral cancer. **Journal of Cancer Research and Treatment**, v. 5, n. 2, p. 247-253, 2009.
- PFREUNDNER, L.; HOPPE, F.; WILLNER, J.; PREISLER, V.; BRATENGEIER, K.; HAGEN, R.; et al. Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin and CT-based 3D radiotherapy in patients with advanced laryngeal and hypopharyngeal carcinomas – a possibility for organ preservation. **Radiotherapy Oncologic**, v. 68, n. 2, p. 163-170, 2003.
- PIGNON, J.P.; BOURHIS, J.; DOMENGE, C.; DESIGNE, L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: Three meta-analyses of updated individual data. **Lancet**, v. 355, n. 9208, p. 949-955, 2000.
- PLATZ, H.; FRIES, R.; HUDEC, M. Retrospective DOSAK Study on carcinomas of the oral cavity: results and consequences. **Journal of Maxillofacial Surgery**, v.13, p. 147-153, 1985.
- RAJENDRAN, R.; SHIRLEY, V. Inducible nitric oxide synthase expression is upregulated in oral submucous fibrosis. **Indian Journal Dental Research**, v. 18, n. 1, p. 94-100, 2007.
- RIBEIRO, D.A.; KITAKAWA, D.; DOMINGUES, M.A.; CABRAL, L.A.; MARQUES, M.E.; SALVADORI, D.M. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. **Experimental Molecular Pathology**, v. 83, n. 1, p. 131-137, 2007.

- RICH, A.M.; READE, P.C. Nuclear morphometric in experimental oral mucosa carcinogenesis. **Oral Oncology, European Journal Cancer**, v. 32B, n. 3, p. 169-175, 1996.
- RODRIGUES, T.L.C.; COSTA, L.J.; SAMPAIO, M.C.C.; RODRIGUES, F.G.; COSTA, A.L.L. Oral leukoplakias: clinical-histopathologic relation. **Pesquisa Odontologica Brasileira**, v. 14, n.2, p. 357-3610, 2000.
- ROSBE, K.W.; PRAZMA, J.; TETRUSZ, P.; MIMS, W.; BALL, S.S.; WEISSLER, M.C. Immuno histochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of head and neck. **Otolaryngology and Head Neck Surgery**, v. 113, n. 6, p. 541-549, 1995.
- RUIZ-RAMOS, R.; LOPEZ-CARRILLO, L.; RIOS-PEREZ, A.D.; DE VIZCAYA-RUÑ-A; CEBRIAN, M.E. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. **Mutatagenesis Research**, v.674, n.1-2, p.109-115. 2009.
- SALLEY, J.J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **Journal of Dental Research**, v. 33, n. 2, p. 253-262, 1954.
- SAMANTA, S.; SWAMY, V.; SURESH, D.; RAJKUMAR, M.; RANA, B.; RANA, A.; CHATTERJEE, M. Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon: removal of O(6)-methylguanine DNA adducts, p53 expression, inducible nitric oxide synthase downregulation and apoptotic induction. **Mutation Research**, v. 650, n.1, p. 123-131, 2008.
- SAPPAYATOSOK, K.; MANEERAT, Y.; SWASDISON, S.; VIRIYAVEJAKUL, P.; DHANUTHAI, K.; ZWANG J.; CHAISRI, U. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. **Medicina oral, Patologia Oral y Cirurgia Oral**, v.14, n.7, p.E319-E324. 2009.
- SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J.. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocol**, v.3, n.6, p.1101-8. 2008.
- SCHWARTZ, J.L.; GU, X.; KITTLES, R.A.; BAPTISTE, A.; SHAKLAR, G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. **Oral Oncology**, v. 36, n. 2, p. 225-235, 2000.
- Scottish Intercollegiate Guidelines Network Diagnosis and management of head and neck cancer A national clinical guideline, 2006.

- SERIL, D.N.; LIAO, J.; YANG, G.Y. Colorectal carcinoma development in inducible nitric oxide synthase-deficient mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, n 5, p. 341-353. 2007.
- SHAH, J.P.; CANDELA, F.C.; PODDAR, A.K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 66, n. 1, p. 109-113, 1990.
- SHAH, N.; TRIVEDI, T.; TANKSHALI, R.; GOSWAMI, J.; JETLY, D.; SHUKLA, S.; SHAH P.; VERMA, R. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. **Head Neck**, v. 31, n. 12, p. 1544-1556, 2009.
- SHANG, Z.J.; LI, J.R. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. **Journal Oral Pathology and Medicine**, v. 34, p. 134-139. 2004.
- SHANG, Z.J.; LI, J.R.; LI, Z.B. Up-regulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Maxillfacial Surgery**, v. 65, p. 17-61. 2007.
- SHINGAKI, S.; SUZUKI, I.; NAKAJIMA, T.; KAWASAKI, T. Evaluation of histopathologic parameters in predicting cervical lymph node metastasis of oral and oropharyngeal carcinomas. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 66, n. 6, p. 683-688, 1988.
- SHKLAR, G. Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 2, p. 1768-1773, 1999.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D. JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.
- SLOOTWEG, P.J.; EVESON, J.W. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). Lyon, I.A.R.C. Press., p. 166-167, 2005.
- SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. TNM: Classification of Malignant Tumours. 6th ed. John Wiley & Sons: New York, 2002.
- SOLT, D.B.; POLVERINI, P.J.; CALDERON, L. Carcinogenic response of hamster buccal pouch epithelium to 4 polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Oral Pathology**, v. 16, n.6, p.294-302, 1987.
- SOO, K.C.; TAN, E.H.; WEE, J.; LIM, D.; TAI, B.C.; KHOO, M.L.; et al. Surgery and adjuvant radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 3, p. 279-286, 2005.

- SOUCEK, L.; WHITFIELD, J.; MARTINS, C.P.; FINCH, A.J.; MURPHY, D.J.; SODIR, N.M.; KARNEZIS, A.N.; SWIGART, L.B.; NASI S.; EVAN, G.I. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. **Nature**, v.455, n.7213, p.679-683. 2008.
- SPAFFORD, M.F.; KOCH, W.M.; REED, A.L.; CALIFANO, J.A.; XU, L.H.; EISENBERGER, C.F.; YIP, L.; LEONG, P.L.; WU, L.; LIU, S.X.; JERONIMO, C.; WESTRA, W.H.; SIDRANSKY, D. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 5, p.607-612, 2001.
- STANLEY, J.S.; YORK, J.L.; BENSON, A.M. Nitroreductases and glutathione transferases that act on 4-nitroquinoline 1-oxide and their differential induction by butylated hydroxyanisole in mice. **Cancer Research**, v. 52, n. 1, p. 5863, 1992.
- STEIDLER, N.E.; READE, P.C. Initiation and promotion of experimental oral mucosa carcinogenesis in mice. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 15, n. 1, p. 4347, 1986.
- TAKAHASHI, M.; KAWABE, T.; OGURA, K.; MAEDA, S.; MIKAMI, Y.; KANEKO, N.; TERANO A.; OMATA, M. Expression of vascular endothelial growth factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.234, n.2, p.493-8, 1997.
- TALAMINI, R.; VACCARELLA, S.; BARBONE, F.; TAVANI, A.; LA VECCHIA, C.; HERRERO, R.; MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. **British Journal of Cancer**, v.83, n.1, p.1238-1242, 2000.
- TANG, X.H.; ALBERT, M.; SCOGNAMIGLIO, T.; GUDAS, L.J. A DNA methyltransferase inhibitor and all-trans retinoic acid reduce oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 12, p. 1100-1110. 2009.
- TANG, X.H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TICKOO, S.; GUDAS, L.J. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 301-313. 2004.
- TAVANI, A.; GALLUS, S.; LA VECCHIA, C.; TALAMINI, R.; BARBONE, F.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. Diet and risk of oral and pharyngeal cancer. An Italian case-control study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 10, n. 1, p. 191- 195, 2001.
- THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemical and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.
- TSCHUDI, D.; STOECKLI, S.; SCHMID, S. Quality of life after different treatment modalities for carcinoma of the oropharynx. **Laryngoscope**, v. 113, n. 11, p. 1949-1954, 2003.

- VAIRAKTARIS, E.; SPYRIDONIDOU, S.; PAPAKOSTA, V.; VYLLIOTIS, A.; LAZARIS, A.; PERREA, D.; YAPIJAKIS C.; PATSOURIS, E. The hamster model of sequential oral oncogenesis. **Oral Oncology**, v.44, n.4, p.315-324. 2008.
- VAN DER WALL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 46, n. 3, p. 423-425, 2010.
- VARGHESE, S.S.; SUNIL, P.M.; MADHAVAN, R.N. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral precancer and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **Cancer Biomarkers**, v. 8, n. 3, p. 155-160, 2010-2011.
- VERED, M.; YAROM, N.; DAYAN, D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncology**, v. 41, n. 4, p. 337-339. 2005.
- VIARISIO, D.; MÜLLER-DECKER, K.; ZANNA, P.; KLOZ, U.; AENGENEYNDT, B.; ACCARDI, R.; FLECHTENMACHER, C.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Novel β -HPV49 Transgenic Mouse Model of Upper Digestive Tract Cancer. **Cancer Research**, 2016.
- WANG, W.C.; CHEN, C.Y.; HSU, H.K.; LIN, L.M.; CHEN, Y.K. Chemopreventive effect of *Toona sinensis* leaf extract on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. **Archives of Oral Biology**, v. 70, n. 1, p. 130-142, 2016.
- WANI, M.K.; YARBER, R.H.; AHMED, A.; HENGSTED, A.; ROBBINS, K.T. Cancer induction in the DMBA hamster cheek pouch: a modified technique using a promoter. **The Laryngoscope**, v. 111, n. 2, p. 204206, 2001.
- WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 45, n. 2, p. 155-166, 2016.
- WARNAKULASURIYA, S.; KOVACEVIC, T.; MADDEN, P.; COUPLAND, V.H.; SPERANDIO, M.; ODELL, E.; MØLLER, H. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 40, n. 9, p. 677-683, 2011.
- WARNAKULASURIYA, S.; REIBEL, J.; BOUQUOT, J.; DABELSTEEN, E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 127-33, 2008.
- WIEST T, SCHWARZ E, ENDERS C, FLECHTENMACHER C, BOSCH FX (). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. **Oncogene**, v. 21, n. 9, p. 1510-1517, 2002.
- WILKEY, J.F.; BUCHBERGER, G.; SAUCIER, K.; PATEL, S.M.; EISENBERG, E.; NAKAGAWA, H.; MICHAYLIRA, C.Z.; RUSTGI, A.K.; MALLYA, S.M. Cyclin D1

overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. **Molecular Carcinogenesis**, v. 48, n. 9, p. 853-861. 2009.

YANG, L.; WANG, Y.; GUO, L.; WANG, L.; CHEN, W.; SHI, B. The Expression and Correlation of iNOS and p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Biomedical Research International**, v. 637853, 2015.

YANG, Z.H.; XU, J.; CHEN, W.L.; PAN, C.B.; LI, J.S.; WANG, J.G. Expression and significance of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in carcinogenesis of hamster cheek pouch. **Ai Zheng**, v. 25, n. 11, p. 1380-1383. 2006.


ZHANG, J.; JING, X.; NIU, W.; ZHANG, M.; GE, L.; MIAO, C.; TANG, X. Peroxiredoxin 1 has an anti-apoptotic role via apoptosis signal-regulating kinase 1 and p38 activation in mouse models with oral precancerous lesions. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 413-420, 2016.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H.T.; DONNINI, S.; GRANGER, H.J.; BICKNELL, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 11, p. 2625-2634. 1997.


ZINGARELLI, B.; HAKE, P.W.; YANG, Z.; O'CONNOR, M.; DENENBERG, A.; WONG, H.R. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. **FASEB Journal**, v.16, n.3, p.327-342. 2002.

ZIOBER, A. F.; PATEL, K.R.; ALAWI, F.; GIMOTTY, P.; WEBER, R.S.; FELDMAN, M.M.; CHALIAN, A.A.; WEINSTEIN, G.S.; HUNT J.; ZIOBER, B.L. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.20 Pt 1, p.5960-5971. 2006.

ANEXO A



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

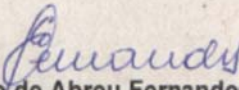


CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 019/11, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Estudo do potencial metastático e do perfil molecular em displasias, carcinomas in situ e carcinomas desenvolvidos em língua de camundongos deficientes para óxido nítrico sintase desafiados com o 4NQO", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Paulo Rogério de Faria**, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **14 de abril de 2011**.

(We certify that the protocol nº 019/11, about "Metastatic potential and molecular profile in dysplasias, carcinomas in situ and carcinomas developed in tongue of oxide nitric synthase-deficient mice challenged with 4NQO", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 14/04/2011).

Uberlândia, 14 de abril de 2011.


Prof. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da Comissão de Ética
Na utilização de animais

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA-Comissão de Ética na Utilização de
Animais-Portaria R N° 1220/2009

ANEXO B

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE BUCAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO

Pesquisador: Paulo Rogério de Faria

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ FUFU/ MG

CAAE: 00593312.1.0000.5152

PARECER DO COLEGIADO

Número do Parecer: 5715

Data da Relatoria: 03/02/2012

Apresentação do Projeto:

O câncer bucal constitui-se em um importante problema que aflige não somente o Brasil. Aqui, o câncer bucal está situado entre as 10 mais frequentes neoplasias e as 20 maiores causas de morte na população. Apresenta prognóstico ruim, pois a maioria é diagnosticada nos estágios III e IV. É nesse contexto que o câncer de boca pode ser considerado como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo e esforços têm que ser tomados para descobrir os mecanismos que norteiam o seu desenvolvimento bem como a sua progressão. Nesse sentido, a via de sinalização Wnt e seus produtos gênicos (proteína APC, beta-catenina, c-myc, ciclina D1 e GSK3beta) aparecem como fortes candidatos no sentido de compreender os mecanismos moleculares que culminam com a transformação maligna e progressão tumoral, em especial o câncer de boca. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos. O estudo será realizado a partir de uma amostra inicial de 243 carcinomas Epidermóides Bucais (CEB) diagnosticados e/ou tratados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia (Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina, Hospital Odontológico e Hospital do Câncer) entre 2006 e 2013 (amostra retrospectiva e prospectiva). Serão incluídos no estudo todos os casos com diagnóstico de CEB (ou sinônimos: carcinoma epidermóide, carcinoma espinocelular) acometendo os tecidos bucais, lábio e orofaringe, correspondendo aos seguintes códigos CID: C00 a C06 e C09 e C10. Para os casos já coletados e para os novos casos (a partir de 2012 até 2013), a coleta dos dados foi e será baseado na utilização de um instrumento de coleta qualificado como um questionário semiestruturado onde constam os itens a serem coletados, a saber: dados relativos às características demográficas e sócio-econômico-culturais dos pacientes como: idade, sexo, cor; sobre comportamentos relacionados à doença: uso de produtos de fumo e álcool; e sobre as características clínico-patológicas da doença: tempo de evolução, localização, dimensão e estadiamento baseado nos critérios do Sistema de Estadiamento da International Union Against Cancer. Também serão coletados, em formulário próprio, dados decorrentes da análise histopatológica dos casos incluídos no estudo, tais como, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão tumoral, invasão angiolinfática e invasão neural e/ou perineural. Para detecção das proteínas relacionadas à via de sinalização Wnt será realizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. A avaliação da imuno-histoquímica para cada proteína será feita pela técnica do Quickscore, que relaciona intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas. Os dados serão descritos por meio de estatística descritiva considerando, quando pertinente, o emprego de médias e/ou medianas, e frequências relativas (percentuais). Serão empregados os testes do Qui Quadrado de Pearson para análise de regressão logística univariada para avaliação das diferentes variáveis estudadas quanto a sua associação com metástases linfonodais, considerando os diferentes antígenos pesquisados, acompanhada de medidas de associação (odds ratio), considerando, a priori, valor de p 0,20. Posteriormente, os dados selecionados quanto a significância serão testados em modelo de regressão logística, para valores de p 0,05. A análise de sobrevida considerará a construção de curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) e analisadas por meio do teste de Log-Rank considerando valores de p 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. Cada antígeno pesquisado será considerado individualmente na análise. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism, versão 4,01 (Graphpad Inc, USA, 2005).

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos.

Objetivos específicos: 1. Identificar e quantificar a expressão dos antígenos (GSK β , β -catenina, ciclina

D1, c-myc, APC) nos casos de carcinomas epidermóides atendidos e tratados no complexo hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia. 2. Analisar a presença de associação entre a expressão dos diferentes produtos gênicos mencionados no item 1 com fatores clínico-patológicos dos casos incluídos no estudo. 3. Analisar, comparativamente, a expressão dos produtos gênicos da ativação do gene Wnt já mencionados (item 1) nos casos de carcinomas epidermóides bucais primários com comportamentos biológicos distintos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto tem por objetivo investigar a existência de associação dos fatores sócio-demográficos e clínico-patológicos de uma amostra de pacientes com câncer bucal (carcinomas epidermóides de boca) com a expressão dos antígenos GSK3 β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, e APC, visando identificar o poder discriminador da expressão destes antígenos de tumores com comportamentos biológicos distintos e prognóstico. Para tanto, utilizaremos uma planilha de banco de dados que está em construção, da qual constam dados cuja natureza foi mencionada anteriormente, dos pacientes com câncer bucal atendidos e tratados no Hospital de Clínicas e Hospital de Câncer em Uberlândia e dados provenientes de análises histológicas que se basearam na avaliação de fragmentos de tumor provenientes de cirurgias realizadas para seu tratamento. Estes fragmentos serão tratados em ambiente de laboratório, sem nenhum envolvimento dos pacientes nestes procedimentos. Assim, todos os dados serão coletados mediante a utilização de um questionário próprio, já empregado anteriormente em outra pesquisa aprovada neste Comitê, referente ao trabalho da CD Cizelene Veloso Faleiros Guedes, intitulado: *“Avaliação do atraso no diagnóstico e tratamento de carcinoma espinocelular em cabeça e pescoço”*, e de Iniciação Científica das alunas Natália Vieira Gonçalves, sub projeto do projeto supracitado, e de Natália Pereira Alves referente ao projeto *“Carcinoma epidermóide bucal: estudo dos fatores associados ao diagnóstico de doença avançada”*, com registros CEP aprovados sob os números 250/08; 202/09 e 264/11, respectivamente. Todos os dados serão coletados posteriormente a adesão espontânea do paciente a pesquisa e sua assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido sobre o conteúdo do trabalho. Nesta planilha, os pacientes são identificados segundo o número de seus prontuários, codificados de forma a não permitir ao leitor sua identificação e a procedência dos dados. Todos os dados coletados estão relacionados ao próprio paciente e a sua doença, sem que seja necessária a sua manipulação ou mesmo a intervenção direta do profissional no paciente, de qualquer tipo para diagnóstico ou tratamento das lesões. Isto será realizado na oportunidade do seu exame clínico ou mesmo da biópsia indicada pelos profissionais nas diferentes clínicas nas quais será atendido, não necessitando, portanto, sua presença no ambiente hospitalar somente para a coleta dos dados. Desta forma, o único risco presente na pesquisa em relação ao paciente é a sua possível identificação na pesquisa, no entanto haverá todos os esforços possíveis e o devido comprometimento da equipe executora com o sigilo absoluto da identidade do sujeito.

Benefícios: Os benefícios para o paciente estão relacionados ao próprio objetivo do projeto, já que visa identificar os fatores preditivos e associados ao processo de metástases, baseados na expressão dos antígenos supracitados. Isto constituirá informação relevante na formulação de intervenções que visem a minimizar o padrão de diagnóstico inadequado ao tratamento e prognóstico da doença para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica e social. Apresenta ampla revisão sobre o estado da arte dos processos relacionados ao tema em estudo.

Não apresenta comprometimento ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

Aprovar o projeto com as avaliações subsequentes dos relatórios a serem apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVAÇÃO do projeto de pesquisa

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

, 24 de Fevereiro de 2012

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado