

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
Emisael Stênio Batista Gomes

**Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina como Potencial Alvo
Terapêutico no Carcinoma Bucal**

Montes Claros – Minas Gerais
2022

Emisael Stênio Batista Gomes

**Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina como Potencial Alvo
Terapêutico no Carcinoma Bucal**

Exame de tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde (PPGCS) da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das doenças
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Montes Claros – Minas Gerais

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS - UNIMONTES

Reitor(a): Antonio Alvimar Souza

Vice-reitor(a): Ilva Ruas de Abreu

Pró-reitor(a) de Pesquisa: Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Maria Alice Ferreira dos Santos

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Sara Gonçalves Antunes de Souza

Pró-reitor(a) de Pós-graduação: André Luiz Sena Guimarães

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Allysson Steve Mota Lacerda

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Marcos Flávio Silveira Vasconcelos
D'Angelo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador(a): Cristina Andrade Sampaio

Coordenador Adjunto(a): Renato Sobral Monteiro Junior

G633i Gomes, Emisael Stênio Batista.
Inibidor da enzima conversora da angiotensina como potencial alvo terapêutico no carcinoma bucal. [manuscrito] / Emisael Stênio Batista Gomes. – Montes Claros (MG), 2022.
113 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2022.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Boca - Câncer. 3. Enzima conversora da angiotensina - Inibidores. 4. Captopril. I. Guimarães, André Luiz Sena. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

BANCA (SUPLENTES)

Prof.^a Dr.^a Lucyana Conceição Farias

Prof.^a Dr.^a Alanna Fernandes Paraíso

A análise realizada pelos membros examinadores da presente defesa pública de TCC teve como resultado parecer de:

APROVAÇÃO

REPROVAÇÃO



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Sena Guimarães, Professor(a)**, em 13/10/2022, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no

art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Macedo Sobrinho Santos, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 09:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCIO BEZERRA SANTOS, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.

6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **54551310** e o código CRC **21CE5D23**.

AGRADECIMENTOS

Dedico essa tese de doutorado a todos os professores que fizeram parte na construção do meu saber. Isso inclui além dos conhecimentos científicos, pois agradeço todos os ensinamentos que me foi atribuído sobre a vida. Foi só através deles que fui capaz de persistir e concluir esse caminho árduo que começou na graduação e que está prestes a finalizar com esse doutorado. Jamais serei capaz de agradecê-los como merecem, pois todos vocês têm um papel fundamental nesta conquista.

Se também fui capaz de chegar até aqui, foi graças a minha família que sempre incentivaram a dedicar-me aos estudos. Vocês foram minha base na vida, no estudo e no mundo. Vocês são exemplos de que eu poderia chegar aonde quisesse, desde que houvesse esforço, sacrifícios, persistência e dedicação. Esse doutorado é prova do amor e apoio integral de todos. Certamente não chegaria onde estou sem os cuidados amorosos que tive. A vocês, meu muito obrigado! Dedico essa tese e toda minha jornada a minha família.

Sou extremamente grato a todas as minhas amigas que construir nesta jornada. Aqueles que se tornaram a família que tive o prazer de escolher. Que me acompanham desde a iniciação científica, onde tudo era mais “simples”. Ter vocês comigo até os dias de hoje, tem sido uma honra, pois poder contar com o apoio afetuoso de todos nessa trajetória, e uma necessidade indispensável. Sinto-me extremamente grato por todas às vezes que me deram forças pra continuar, nos momentos de fraqueza, dor, cansaço físico e emocional. Esse título de doutorado não é só meu, ele com certeza é nosso!

Presto também essa tese de doutorado a melhor instituição (Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES) que eu poderia escolher. Por todo apoio, estrutura e portas que me foram abertas, hoje sei que não poderia ter feito escolha melhor. Estudar nessa instituição foi uma experiência completa, desde a sala de aula e a convivência com os colegas com quem dividi tantos aprendizados até o desenvolvimento dessa tese. Sou grato por tudo que fizeram por mim.

Deixo os meus genuínos agradecimentos aos órfãos de fomento, pois este estudo e demais outros, foram financiados por bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pois seria inviável a corroboração ou refutação de nossas hipóteses científicas sem o apoio destes órgãos. Agradeço também a toda equipe e membros do Hospital Universitário Clemente de Faria (HU), do município de Montes Claros, Minas Gerais, por todo o amparo e carinho que nos foram prestados.

Agradeço plenamente a todos os professores e doutores que aceitaram e fizeram parte das bancas examinadoras do presente trabalho, da qualificação à tese de doutorado, dos suplentes aos titulares. Para minha pessoa tem sido uma honra poder ser avaliado e instruído com tamanha experiência e sabedoria. Vocês são exemplos aonde pretendo chegar. Obrigado a todos por contribuir, e por aceitar fazer parte de algo muito especial na minha vida.

Ao meu professor, instrutor e orientador, André Luiz Sena Guimarães, por não ser apenas isso, mas sim, um grande amigo, parceiro e irmão, agradeço profundamente por todos os ensinamentos, pelas oportunidades, e por não apenas acreditar em meu potencial, mas por me conduzir em um universo científico o qual desconhecia, mas que sempre sonhei conhecer. Obrigado pela compreensão dos obstáculos que passei os quais estes abalaram-me psicologicamente, pois você não apenas compreendeu, mas me deu forças e ferramentas para seguir em frente. Demorei anos para entender que seu jeito de ser para com todos nós, seus alunos, nada mais era para nossa capacitação profissional, e para nos ensinar a persistir onde as portas se fecham, uma vez que nem tudo neste mundo são flores, mas que com as experiências e o aprendizado que nos foram passados, nos fazem “fortes” para prosseguir. Foi uma enorme satisfação André ser seu discípulo.

Neste período, aprendi que uma tese ou qualquer outro trabalho é a extensão da vida do autor. Então, para algo de valor seja produzido, a pessoa deve primeiro criar algo de valor em si mesma. Pessoa e obra são consistentes com o resultado. Por esse motivo, deixo os meus mais sinceros e profundos agradecimentos a todas as pessoas que muito me encorajaram e me ajudaram a produzir algo de valor em minha vida.

E por fim deixo os meus agradecimentos Ao mais importante, a Deus todo poderoso, pois sem sua misericórdia, e sem seu amor incondicional, não estaria aqui para vivenciar a finalização desta importantíssima etapa da minha vida. Tudo que tenho, tudo que sou, e tudo que faço parte, é porque o Senhor permitiu, glorifico e exalto o teu santo Nome por isso, pois assim está escrito: *“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco”* (1 Tessalonicenses 5:18). Pois acima de todo o conhecimento científico que obtive, o Senhor proporcionou-me o conhecimento mais importante, o “conhecimento espiritual”, pois este me conduzirá para um patamar além de todos os olhos humanos jamais vistos, onde alcançarei a maior de todas as conquistas terrenas, “a vida eterna”. A Trindade, a minha maior de todas as gratidões.

*"Não acumulem para vocês tesouros na terra, onde a traça e a ferrugem destroem, e onde os ladrões arrombam e furtam.
Mas ajuntai tesouros no céu, onde a traça e a ferrugem não destroem, e onde os ladrões não arrombam nem furtam.
Pois onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração."*

Mateus 6:19-21

Resumo

O câncer é uma doença que representa um importante problema de saúde pública no mundo, uma vez que as neoplasias são uma das principais causas de morte. Espera-se um aumento da morbidade e mortalidade nos próximos anos. O carcinoma de células escamosas da oral (CCEO) é o subtipo histológico mais comum representando mais de 90% dos tipos de câncer da cavidade oral (CCO). Os principais fatores de risco são a intoxicação por álcool e tabaco, infecção por vírus oncogênicos, e também as chamadas lesões potencialmente cancerizáveis. O tratamento para câncer de células escamosas em estágio inicial da cavidade oral geralmente é de modalidade única, seja cirurgia ou radioterapia. O tratamento para câncer localmente avançado é multimodal, com cirurgia seguida de radiação adjuvante ou quimiorradiação, conforme indicado por características patológicas ou quimiorradiação definitiva. No entanto, descobertas científicas para novas modalidades terapêuticas são bem aceitas, uma vez que as taxas de mortalidade para o câncer da cavidade oral ainda permanecem altas. O sistema renina-angiotensina (SRA) geralmente está associado à sua ação sistêmica na homeostase cardiovascular. No entanto, há evidências crescentes que alguns componentes do SRA, seja eles; pela via da enzima conversora da angiotensina (ECA), angiotensina II (Ang II), e ativação do receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1R - *angiotensin II type 1 receptor*), tem demonstrado está envolvida na regulação da proliferação celular, angiogênese, inflamação e remodelação tecidual, o que não só propõem, mas também provam desempenhar um papel no câncer, induzindo o crescimento e metástase tumoral. Sugerindo a avaliação da inibição de alguns compostos do SRA como tratamento do CCEO. Visto que o SRA pode desempenhar um papel na carcinogênese, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) sobre os efeitos proliferativos, invasivos e metastáticos no CCEO em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a fim de discutir o desenvolvimento de drogas que visam o SRA como potencial alvo terapêutico para o tratamento do CCEO. Nossos resultados em ambos os ensaios revelaram associação no desenvolvimento do CCEO e o uso de um IECA, em decorrência da atenuação do crescimento do carcinoma oral e seu de poder invasivo.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas Oral, Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina, Captopril.

Summary

Cancer is a disease that represents an important public health problem in the world since neoplasms are one of the main causes of death. An increase in morbidity and mortality is expected in the coming years. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common histological subtype, accounting for more than 90% of oral cavity cancers (OCC). The main risk factors are alcohol and tobacco intoxication, oncogenic virus infection, and the appearance of potentially cancerous lesions. Treatment for early-stage squamous cell cancer of the oral cavity is usually a single modality, either surgery or radiation therapy. Treatment for locally advanced cancer is multimodal, with surgery followed by adjuvant radiation or chemoradiation as indicated by pathologic features or definitive chemoradiation. However, scientific findings for new therapeutic modalities are well accepted, since mortality rates for cancer of the oral cavity still remain high. The renin-angiotensin system (RAS) is generally associated with its systemic action on cardiovascular homeostasis. However, there is growing evidence that some components of the RAS, be them; via the angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II (Ang II), and activation of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) are involved in the regulation of cell proliferation, angiogenesis, inflammation, and tissue remodeling, which is not only proposed but also proven to play a role in cancer, inducing tumor growth and metastasis. Suggesting the evaluation of the inhibition of some RAS compounds as a treatment for OSCC. Since the RAS may play a role in carcinogenesis, this study aimed to evaluate the impact of an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) on the proliferative, invasive, and metastatic effects on OSCC *in vitro* and *in vivo* assays, to discuss the development of drugs that target the RAS as a potential therapeutic target for the treatment of OSCC. Our results in both trials revealed an association between the development of OSCC and the use of an ACEI, due to the attenuation of the growth of oral carcinoma and its invasive power.

Keywords: Oral Squamous Cell Carcinoma, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, Captopril.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	Angiotensina 1-9
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor da Angiotensina II Tipo 1 / <i>Angiotensin II Type 1 Receptor</i>
AT2R	Receptor da Angiotensina II Tipo 2 / <i>Angiotensin II Type 2 Receptor</i>
b-FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico / <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BRAs	Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina
CAL	Ceratose Actínica Labial
CAM	Membrana Corioalantóica
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CCO	Câncer da Cavidade Oral
CCOs	Canceres da Cavidade Oral
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
cDNA	DNA complementar
DL	Displasia Liquenóide
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina II
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico / <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial / <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
Fen	Fenilalanina
Fig	Figura
GCO	Cancer Observatory
GPI	Glicosilfosfatidilinositol / <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
His	Histidina
HPV	Papilomavírus Humano / <i>Human Papillomavirus</i>
HVO	Hiperplasia verrucosa oral
I/D	Inserção/Deleção
IECA	Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina
IECAs	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
kDa	Quilodalton

KKS	Sistema Caliceína-Cinina / Kinin–Kallikrein System
LEDC	Lúpus Eritematoso Discóide Crônico
Leu	Leucina
LPC	Lesões Pré-Cancerosas
LPO	Líquen Plano Oral
M	Metástases a Distância
MasR	Receptor Acoplado à Proteína G / <i>G Protein-Coupled Receptor</i>
MASRs	Receptores Acoplado à Proteína G / <i>G Protein-Coupled Receptor</i>
µg	Micrograma
µm	Micrometro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos / <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
N	Linfonodos Regionais
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína Tumoral / Tumor Protein
Pb	Pares de Bases
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas / <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PRR	Receptor de Pró-Renina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SIN	Sintomas de Impacto Nutricional
SRA	Sistema Renina Angiotensina
T	Tumor Primário
TNM	Classificação dos Tumores Malignos
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular / <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGF2/Fik-1	Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2 / <i>Receptor de Domínio de Inserção de Quinase</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFENCIAL TEÓRICO	20
2.1	CÂNCER BUCAL	20
2.1.1	<i>Histopatologia</i>	21
2.1.2	<i>Fatores de risco</i>	24
2.1.5.1	Tabaco e alcoolismo	24
2.1.5.1	Fatores nutricionais	24
2.1.5.1	Papilomavírus Humano (HPV - Human Papillomavirus)	25
2.1.5.1	Lesões potencialmente cancerizáveis (LPC)	25
2.1.5.1	Leucoplasia	26
2.1.5.1	Leucoplasia proliferativa verrucosa	28
2.1.5.1	Líquen plano oral	29
2.1.5.1	Displasia liquenóide	30
2.1.5.1	Lúpus Eritematoso Discóide Crônico (LEDC)	31
2.1.5.1	Eritroplasia	32
2.1.5.1	Hiperplasia verrucosa oral	33
2.1.5.1	Ceratose actínica labial	35
2.1.5.1	Outros fatores de risco	36
2.1.3	<i>Aspecto clínico</i>	37
2.1.4	<i>Classificação clínica / Estadiamento</i>	38
2.1.5	<i>Tratamento</i>	40
2.1.5.1	Implicações pós-tratamentos	42
2.1.6	<i>Elementos contribuintes para complicações do CCEO</i>	43
2.2	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	44
2.3	PAPEL FISIOLÓGICO DA ECA	45
2.3.1	<i>Enzima conversora da angiotensina</i>	46
2.3.2	<i>Fatores que influenciam os níveis de ECA</i>	47
2.4	SRA VIA ANG II-AT1R NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER	48
2.5	INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA	52
2.5.1	<i>Efeito anticancerígeno dos IECAs</i>	54
3	OBJETIVO	57
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4	HIPÓTESE	59
5	PRODUTO	60
6	REFERÊNCIAS	96
7	ANEXO A	113

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem demonstrado o seu grande impacto na saúde pública, diante disso a sua relevância tem impactado no cenário mundial em razão de sua implicação de seus resultados na morbimortalidade, e seus transcendentes custos aos sistemas de saúde. Segundo a OMS (organização mundial da saúde) entre 2000 e 2019, o câncer ocupou a segunda maior causa de morte em todo o mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (1). Dados mundial do Global Cancer Observatory (GCO / GLOBOCAN) estimam que em 2020 tenham ocorrido 19 292 789 casos de câncer e quase 10 000 000 de mortes. Os tipos mais recorrentes são o câncer de mama entre as mulheres, pulmão, colorretal e o de próstata (Figura 1). Essas mesmas fontes exibem dados em seus registros para os cânceres de lábio e cavidade oral, revelando 377 713 novos casos (Figura 2), e uma taxa de incidência padronizadas por idade de 6,0/100 000 habitantes para o sexo masculino e 2,3/100 000 para o sexo feminino, somando os dois tipos e em ambos os sexos as taxas de mortalidade totalizam 1,9/100 000 habitantes (Figura 3) (2). Pesquisas de série temporal têm evidenciado que a tendência de morbimortalidade do câncer oral no mundo modifica mediante os comportamentos dos habitantes frente aos fatores de risco (3). Essa população pode estar associada ao estilo de vida (consumação de tabaco, ingestão exagerada de álcool, dieta com déficit de nutrientes e o sedentarismo), exposição a substâncias químicas e radioativas, ou biológicas como cepas do Papilomavírus Humano (HPV)(4).

Deve-se também ponderar o resultado sinérgico entre todos os fatores de risco (5) pois, quando agregados a predisposição genética, podem desenvolver a oncogênese, o que por sua vez, é concebido por mutações genéticas ou erros na homeostase do ciclo celular, com proliferação exacerbada das células e invasão descontrolada em tecidos normais, falhas na apoptose e modificações nas interações células e meio (6).

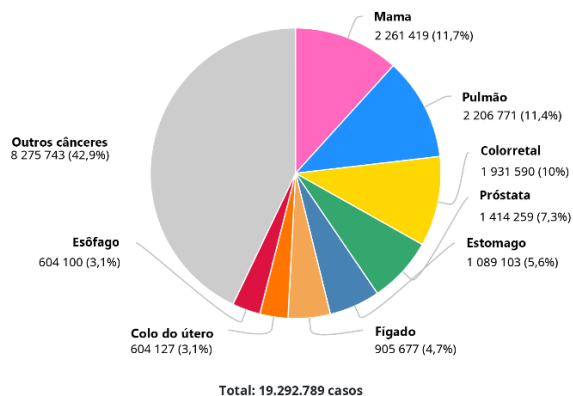
O tratamento para câncer de células escamosas oral (CCO) em estágio inicial é geralmente modalidade única, seja cirurgia ou radioterapia. O tratamento no geral para câncer de cabeça e pescoço (CCP) localmente avançado é multimodal, com cirurgia seguida de radiação adjuvante ou quimiorradiação, conforme indicado por características patológicas ou quimiorradiação definitiva. Para doença recorrente que não é passível de abordagem local ou

Todos os cânceres

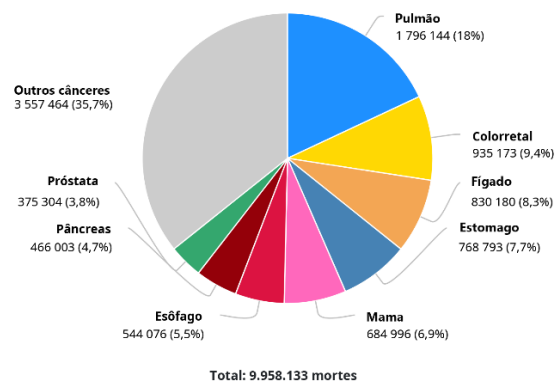
Fonte: Globocan 2020



Número de novos casos em 2020, ambos os sexos, todas as idades



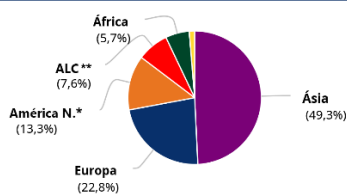
Número de mortes em 2020, ambos os sexos, todas as idades



Estadísticas de incidência e mortalidade por câncer em todo o mundo e por região

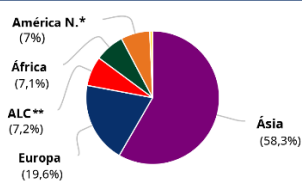
	Incidência						Mortalidade					
	Ambos os sexos		HOMENS		MULHERES		Ambos os sexos		HOMENS		MULHERES	
	Novos casos	risco 0-74 (%)	Novos casos	risco 0-74 (%)	Novos casos	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)
África Oriental	331 233	13,56	126 826	11,90	204 407	15,12	222 189	9,91	88 039	8,71	134 150	11,02
África Central	106 467	11,68	45 718	11,71	60 749	11,83	71 570	8,35	31 814	8,25	39 756	8,54
Norte da África	307 507	14,61	148 423	15,14	159 084	14,16	191 081	9,21	103 915	10,43	87 166	8,05
África do Sul	116 391	20,00	54 358	22,74	62 033	18,22	61 659	11,50	29 578	13,38	32 081	10,22
África Ocidental	247 611	11,69	100 428	10,67	147 183	12,71	164 930	8,44	70 537	7,89	94 393	8,99
Caribe	113 280	19,72	59 679	22,35	53 601	17,42	65 954	10,44	36 290	11,83	29 664	9,23
América Central	261 646	14,30	120 657	14,71	140 989	14,01	126 071	6,91	61 544	7,15	64 527	6,72
América do Sul	1 095 348	20,24	539 931	22,09	555 417	18,79	521 389	9,45	267 301	10,59	254 088	8,51
América do Norte	2 556 862	33,93	1 372 002	37,05	1 184 860	31,09	699 274	9,22	367 856	31,10	331 418	8,23
Ásia Oriental	6 008 355	21,91	3 295 730	24,58	2 712 625	19,37	3 617 104	13,10	2 174 803	16,35	1 442 301	9,87
Sudeste Asiático	1 100 037	15,62	526 190	16,46	573 847	15,03	689 093	10,08	373 795	11,82	315 298	8,55
Centro-Sul da Ásia	1 951 843	10,93	966 677	11,13	985 166	10,78	1 258 683	7,41	660 359	7,88	598 324	6,95
Ásia Ocidental	443 475	18,31	232 598	20,77	210 877	16,38	244 551	10,60	141 031	13,09	103 520	8,38
Europa Central e Oriental	1 314 193	25,50	657 259	30,47	656 934	22,18	695 828	13,36	382 003	18,24	313 825	9,79
Europa Ocidental	1 424 394	31,24	780 757	34,90	643 637	27,85	559 671	10,85	310 542	13,00	249 129	8,83
Sul da Europa	953 048	27,40	523 184	31,31	429 864	23,85	423 090	10,52	243 964	13,18	179 126	8,07
Norte da Europa	706 808	30,45	378 417	32,91	328 391	28,19	276 642	10,25	147 516	11,39	129 126	9,20
Austrália e Nova Zelândia	235 955	40,43	128 091	44,37	107 864	36,45	58 744	8,55	32 746	9,76	25 998	7,38
Melanésia	15 658	19,95	6 984	20,62	8 674	19,59	9 022	12,58	4 283	13,21	4 739	12,12
Polinésia	1 668	24,02	871	26,40	797	21,71	927	13,93	521	16,09	406	11,81
Micronésia	1 010	18,85	525	21,05	485	16,89	661	12,66	373	15,37	288	10,10
IDH baixo	650 423	12,07	262 772	11,04	387 651	13,10	439 852	8,80	186 210	8,14	253 642	9,46
IDH médio	2 326 748	11,52	1 135 648	11,75	1 191 101	11,35	1 513 219	7,87	788 456	8,45	724 763	7,32
IDH alto	7 371 321	19,53	3 837 153	21,49	3 534 168	17,79	4 521 833	12,23	2 625 384	14,90	1 896 449	9,69
IDH muito alto	8 934 818	28,93	4 824 700	32,64	4 110 118	25,75	3 478 767	10,40	1 926 292	12,67	1 552 475	8,37
Mundo	19 292 789	20,44	10 065 305	22,60	9 227 484	18,55	9 958 133	10,65	5 528 810	12,59	4 429 323	8,86

Incidência, ambos os sexos



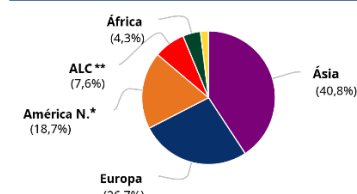
População	Número
Ásia	9 503 710
Europa	4 398 443
* América do Norte	2 556 862
** América Latina e Caribe	1 470 274
África	1 109 209
Oceânia	254 291
Total	19 292 789

Mortalidade, ambos os sexos



População	Número
Ásia	5 809 431
Europa	1 955 231
** América Latina e Caribe	713 414
África	711 429
* América do Norte	699 274
Oceânia	69 354
Total	9 958 133

Prevalência em 5 anos, ambos os sexos



População	Número
Ásia	20 606 063
Europa	13 496 763
* América do Norte	9 456 199
** América Latina e Caribe	3 837 718
África	2 166 740
Oceânia	986 804
Total	50 550 287

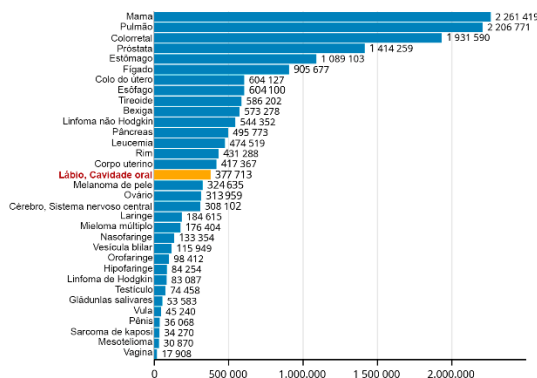
Figura 1. Dados mundial do Global Cancer Observatory (GCO / GLOBOCAN) de 2020. Ilustração dos índices de novos casos, número de morte, incidência e prevalências em 5 anos para todos os tipos de câncer. Fonte: (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>). Adaptada (traduzida).

Lábio, cavidade oral

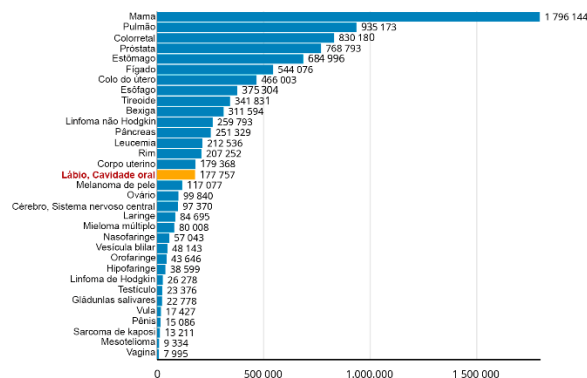
Fonte: Globocan 2020



Número de novos casos em 2020, ambos os sexos, todas as idades



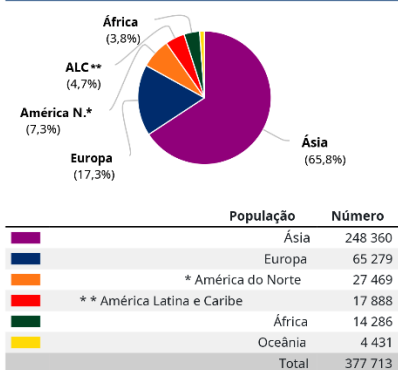
Número de mortes em 2020, ambos os sexos, todas as idades



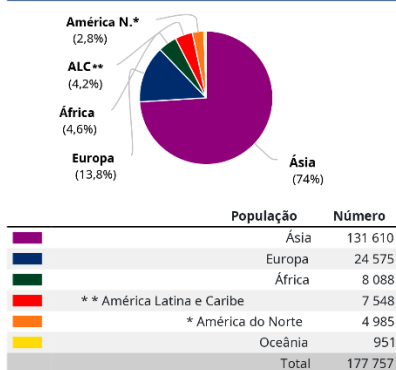
Estatísticas de incidência e mortalidade por câncer em todo o mundo e por região

	Incidência						Mortalidade					
	Ambos os sexos		HOMENS		MULHERES		Ambos os sexos		HOMENS		MULHERES	
	Novos casos	risco 0-74 (%)	Novos casos	risco 0-74 (%)	Novos casos	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)	Mortes	risco 0-74 (%)
África Oriental	4 653	0,22	2 690	0,28	1 963	0,18	2 980	0,16	1 716	0,20	1 264	0,12
África Central	1 431	0,18	879	0,23	552	0,13	904	0,12	552	0,16	352	0,09
Norte da África	3 216	0,16	1 727	0,19	1 489	0,14	1 466	0,07	739	0,08	727	0,06
África do Sul	2 132	0,45	1 305	0,66	827	0,28	914	0,20	596	0,33	318	0,10
África Ocidental	2 854	0,16	1 573	0,17	1 281	0,14	1 824	0,11	1 003	0,12	821	0,10
Caribe	1 679	0,33	1 193	0,53	486	0,16	668	0,12	482	0,20	186	0,04
América Central	2 018	0,12	886	0,12	1 132	0,12	853	0,05	446	0,06	407	0,04
América do Sul	14 191	0,29	9 636	0,46	4 555	0,14	6 027	0,12	4 252	0,21	1 775	0,05
América do Norte	27 469	0,51	18 513	0,73	8 956	0,29	4 985	0,08	3 224	0,11	1 761	0,04
Ásia Oriental	51 158	0,21	33 658	0,29	17 500	0,13	21 933	0,08	14 083	0,11	7 850	0,05
Sudeste Asiático	18 381	0,29	11 297	0,38	7 084	0,21	9 925	0,15	6 409	0,21	3 516	0,09
Centro-Sul da Ásia	174 448	1,01	130 725	1,48	43 723	0,53	98 015	0,59	72 311	0,84	25 704	0,33
Ásia Ocidental	4 373	0,20	2 716	0,26	1 657	0,14	1 737	0,08	958	0,09	779	0,06
Europa Central e Oriental	26 083	0,61	19 884	1,12	6 199	0,21	12 490	0,29	9 761	0,56	2 729	0,09
Europa Ocidental	17 770	0,55	11 127	0,76	6 643	0,36	5 133	0,14	3 419	0,21	1 714	0,07
Sul da Europa	12 387	0,42	7 926	0,61	4 461	0,23	4 234	0,13	2 751	0,20	1 483	0,06
Norte da Europa	9 039	0,54	5 582	0,72	3 457	0,36	2 718	0,14	1 714	0,20	1 004	0,08
Austrália e Nova Zelândia	3 096	0,70	2 070	1,01	1 026	0,41	469	0,09	281	0,13	188	0,05
Melanésia	1 299	2,05	796	2,82	503	1,35	468	0,82	313	1,19	155	0,48
Polinésia	20	0,32	16	0,52	4	0,12	8	0,11	7	0,22	1	0
Micronésia	16	0,36	12	0,64	4	0,12	6	0,16	5	0,34	1	0
IDH baixo	10 126	0,22	5 883	0,27	4 243	0,17	6 251	0,15	3 622	0,18	2 629	0,12
IDH médio	177 018	0,91	132 012	1,35	45 006	0,48	99 662	0,53	73 289	0,77	26 373	0,29
IDH alto	72 418	0,21	46 009	0,29	26 409	0,14	34 765	0,10	22 857	0,14	11 908	0,06
IDH muito alto	118 036	0,50	80 219	0,76	37 817	0,26	37 048	0,14	25 230	0,23	11 818	0,06
Mundo	377 713	0,46	264 211	0,68	113 502	0,26	177 757	0,22	125 022	0,32	52 735	0,12

Incidência, ambos os sexos



Mortalidade, ambos os sexos



Prevalência em 5 anos, ambos os sexos

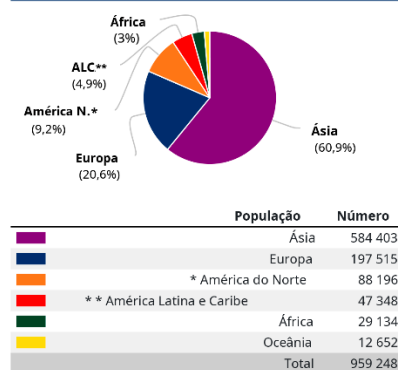


Figura 2. Dados mundial do Global Cancer Observatory (GCO / GLOBOCAN) de 2020. Ilustração dos índices de novos casos, número de morte, incidência e prevalências em 5 anos para cânceres de lábio e cavidade oral. Fonte: (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>). Adaptada (traduzida).

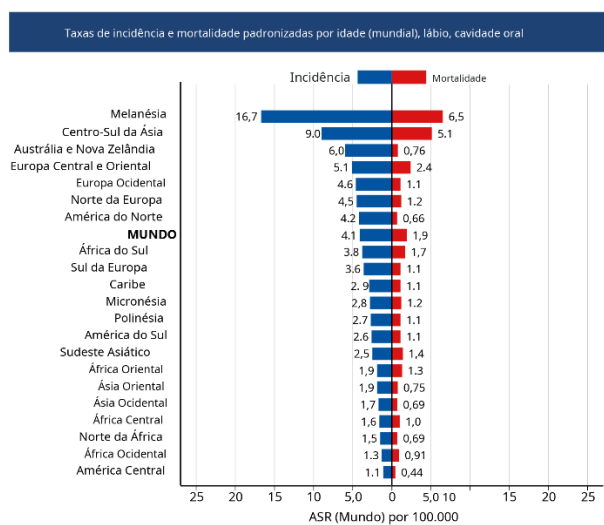
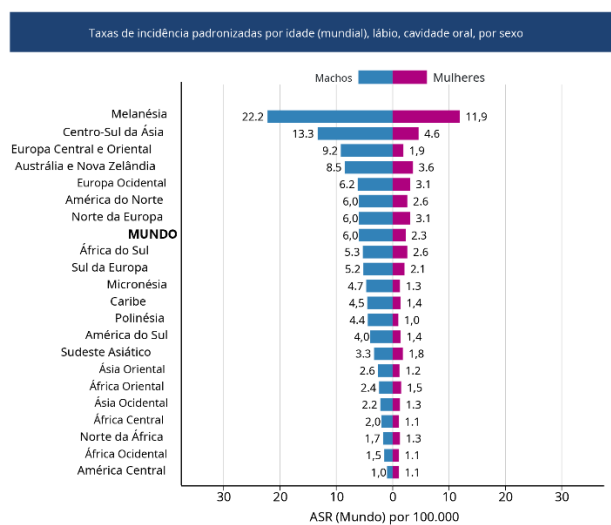
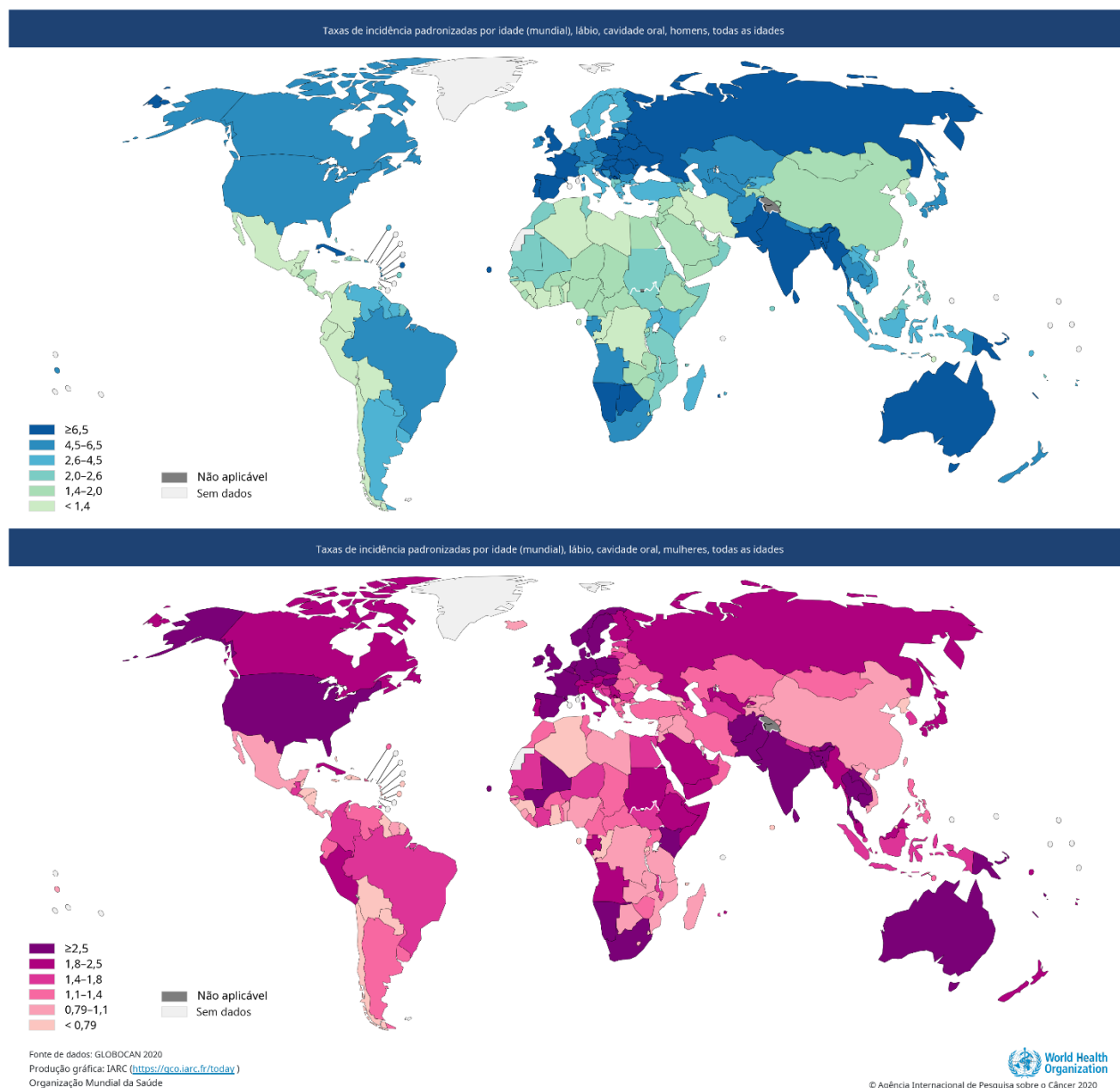


Figura 3. Dados mundial do Global Cancer Observatory (GCO / GLOBOCAN) de 2020. Taxas de incidência padronizadas por idade (mundial), lábio, cavidade oral, homens e mulheres para todas as idades. Fonte (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>). Adaptada (traduzida).

regional de resgate e para doença metastática, a quimioterapia com ou sem agente biológico é indicada (7, 8).

O conceito de qualidade de vida, incluindo domínios relacionados ao funcionamento físico, mental, emocional e social que se concentram na satisfação geral da vida (9), tornou-se cada vez mais proeminente na prática oncológica onde a expectativa de vida é limitada (10). Os encargos do tratamento podem persistir anos depois, principalmente para os tratamentos invasivos (11, 12). Nas últimas décadas, a ênfase foi colocada na “qualidade de vida” além da “quantidade de vida” ao considerar a capacidade do sobrevivente de lidar com as consequências após sua doença e os efeitos colaterais do tratamento (13).

Estima-se que 90% dos sobreviventes de CCP experimentam taxas excepcionalmente altas de sintomas de impacto nutricional (SIN) na sobrevivência como resultado da localização do tumor e tratamento agressivo com radiação na região da cabeça e cavidade oral (14, 15). Embora haja melhorias notáveis na sobrevida com o tratamento com altas doses de radiação, (16) esses protocolos contribuem para uma carga significativa dos SIN durante e após o tratamento (17). Os SIN referem-se a quaisquer efeitos adversos ou sintomas que comprometam a capacidade e/ou o desejo de comer e beber, incluindo, entre outros, disfagia, trismo, xerostomia, dificuldade de mastigação, mucosite, e alterações de sabor (15). Embora seja possível que os SIN agudo resolvam após o tratamento, os mesmos podem continuar por meses ou anos após a conclusão da terapia, e se tornar um problema crônico de saúde (15, 18). Os SIN crônico podem ter efeitos potencialmente devastadores no bem-estar geral dos sobreviventes, pois a capacidade alimentar pode nunca voltar ao normal, forçando os sobreviventes a fazer adaptações e reaprender a comer (18). Além da dificuldade de alimentação física, também podem existir desafios psicológicos, sociais e emocionais, dada a importância da alimentação no dia a dia, sendo assim prejudicando a qualidade de vida do paciente (17).

Mesmo com a evolução nos avanços científicos para as modalidades de tratamentos de câncer oral nos últimos anos, a incidência e mortalidade para o câncer da cavidade oral (CCO) ainda permanece altas devido ao rápido crescimento das células neoplásicas, invasividade e metástase à distância (7, 8, 19, 20). Sendo assim a exploração de mecanismos subjacentes ao desenvolvimento do CCO é indispensável, para descobertas de potenciais agentes terapêuticos que não sejam invasivos e de baixo ou nenhuma toxicidade de modo que possam ser utilizados como terapia sinérgica associada aos tratamentos convencionais, minimizando seus efeitos colaterais proporcionando melhores resultados e qualidade de vida durante e pós tratamento.

O sistema renina angiotensina (SRA) é a principal via endócrina envolvida na regulação da função cardiovascular, renal e neuroendócrina. É o principal regulador fisiológico da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico na manutenção da homeostase (21-24). Evidências sugerem que o SRA desempenha um papel importante no desenvolvimento da carcinogênese. Estudos pré-clínicos e clínicos mostram que o SRA é ativo, especialmente em alguns tipos de câncer (25-27). Pois por meio da ativação do receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1R - *angiotensin II type 1 receptor*) através da angiotensina II (Ang II), pode influenciar na apoptose, migração, proliferação celular, angiogênese e inflamação (28-31). Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs) são medicamentos comumente usados como agentes anti-hipertensivos, que medeiam seus efeitos através da inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), impedindo a conversão da angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), o peptídeo chave do SRA, impedindo a ativação do AT1R. Estudos científicos revelam que os IECAs desempenham um papel fundamental na prevenção, regressão da carcinogênese, prolongamento da sobrevida, e um anti-metastático em paciente com diferentes tipos de câncer (32-47). O presente trabalho teve como desígnio avaliar um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) e sua interferência no desenvolvimento no carcinoma de células escamosas oral (CCEO) a fim de corroborar ou refutar a hipótese do IECA como um potencial alvo terapêutico na carcinogênese oral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER BUCAL

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Mais de 19 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer, e um índice de óbitos superior a 9 milhões de indivíduos em 2020. O CCO é categorizado como um CCP e ocupa a décima sexta posição em malignidade comparados com os demais tipos de cânceres (2). A cavidade oral é uma denominação anatômica ampla que agrupa várias sub-localizações. Inclui as regiões desde as arcadas dentárias até a junção com a orofaringe. Inclui também a face interna das bochechas, os lábios mucosos e o vestíbulo correspondente à membrana mucosa localizada entre as arcadas dentárias e a face interna das bochechas e lábios. Portanto, o exame clínico da cavidade oral requer palpação e inspeção por desdobraimento da mucosa de inúmeros sulcos anatômicos. As principais localizações dos CCO são (48):

- Língua móvel que inclui uma face dorsal e uma face ventral, as bordas laterais e a ponta. A "zona de junção" é uma zona limite localizada entre a lingueta móvel e a base da lingueta. A base da língua não faz parte da cavidade oral no sentido estrito. Faz parte do anel linfóide de Waldeyer com as amígdalas e pertence à orofaringe;
- O assoalho da boca que inclui as regiões laterais e uma parte anterior. É delimitado lateralmente pelo sulco pelvi-gengival e medialmente pelo sulco pelvi-lingual;
- As outras localizações menos frequentes são os lábios mucosos com clara predominância do lábio inferior, a face interna das bochechas, a comissura intermaxilar, as gengivas ou o palato duro. O palato duro ou palato ósseo também pertence à cavidade oral, ao contrário do palato mole comumente conhecido como palato mole, que constitui a parte superior e anterior da orofaringe.

Resumidamente o CCO é uma neoplasia maligna e inclui subsídios da mucosa bucal, assoalho da boca, língua anterior, rebordos alveolares, trígono retromolar, palato duro, e parte

interna dos lábios (Figura 4) (49). Em 2020, o CCO e do lábio foram responsáveis por 377.713 novos casos e 177.757 mortes em todo o mundo como ilustra a Figura 2 (2, 50).

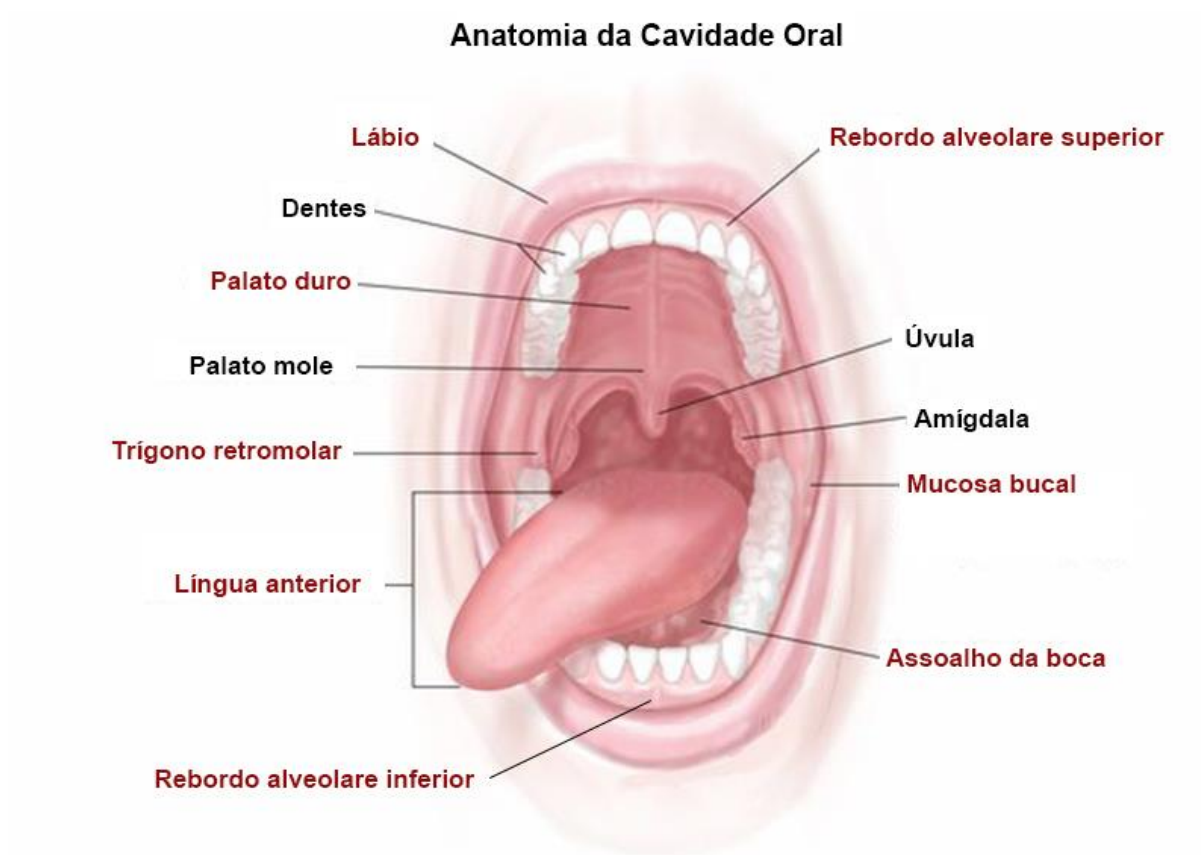


Figura 4. Cavidade oral. Subsídios da mucosa bucal (destaque em vermelho) onde acomete neoplasias malignas denominadas de câncer da cavidade oral. Fonte: (<https://bit.ly/3fOWhAN>). Adaptada (traduzida).

2.1.1 Histopatologia

O câncer bucal surge através de uma série de estágios histopatológicos, desde hiperplasia benigna até displasia e carcinoma *in situ* seguido de carcinoma de células escamosas invasivo (Figura 5). Mais de 90% dos CCO originam-se dos tecidos escamosos, daí amplamente conhecido como CCEO (51, 52). A malignidade geralmente é precedida por lesões potencialmente cancerizáveis que também são responsáveis por esse mesmo tipo histológico. Entre outros tumores epiteliais, os carcinomas glandulares como adenocarcinomas

e carcinomas adenoides císticos são muito mais raros. Desenvolvida à custa das glândulas salivares acessórias, a evolução geralmente é mais lenta e menos sintomática. A localização palatina é frequente e explica a invasão óssea habitual. Tumores não epiteliais como sarcomas (principalmente osteossarcomas ou rabdomiossarcomas) também são cânceres raros da cavidade oral e geralmente acometem pacientes mais jovens. Outros subgrupos histológicos, como melanomas de mucosa ou hemopatias, também são descritos, mas permanecem excepcionais (53). Além disso, a detecção de um câncer oral no estágio I traz um prognóstico de 80% de sobrevida, enquanto a mesma lesão no estágio III traz uma sobrevida de 20%. Essa diferença pode afetar não apenas a qualidade de vida dos pacientes, mas também o custo dos tratamentos médicos de pacientes com câncer oral. Além do mais, o CCO tem uma taxa de recorrência muito alta. Os pacientes que sobrevivem a um primeiro encontro com esta doença têm um risco até 20 vezes maior de desenvolver um segundo câncer (54, 55).

Campo de cancerização refere-se ao potencial desenvolvimento de câncer em vários locais (56, 57). Isso foi observado durante o desenvolvimento do câncer nos tecidos cobertos por epitélio escamoso (tumor de cabeça e pescoço) e epitélio de transição (carcinoma urotelial). É evidente que o câncer bucal, assim como os carcinomas em outros tecidos, se desenvolve ao longo de muitos anos e, durante esse período, ocorrem múltiplos locais de transformação neoplásica em toda a cavidade oral. Mutações deste gene foram observadas em vários locais de leucoplasia pré-maligna e carcinoma na mesma cavidade oral (58). Uma redução na atividade supressora de tumor pelo gene P53 e o desenvolvimento de mutações têm sido associados ao tabagismo e a um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma oral (59). Portanto, apresentações multifocais e expressões mutacionais de genes supressores de tumor podem ser consequência da exposição a longo prazo (por exemplo, 20 ~ 40 anos) a vários fatores ambientais e exógenos. A presença contínua de mutações também pode significar mudanças no reparo do DNA e apoptose, aumentando assim a suscetibilidade para transformações futuras. Adaptações mutacionais que modificam a capacidade de sobrevivência de clones particulares de células em transformação também podem aumentar ainda mais o nível de resistência ao controle terapêutico. Análises genéticas recentes revelaram que os cânceres que se desenvolvem em locais distantes na cavidade oral muitas vezes são derivados do mesmo clone inicial (60). A multiplicidade do processo de carcinogênese oral dificulta a interrupção da progressão para câncer por meio da remoção cirúrgica de uma lesão pré-maligna (61).

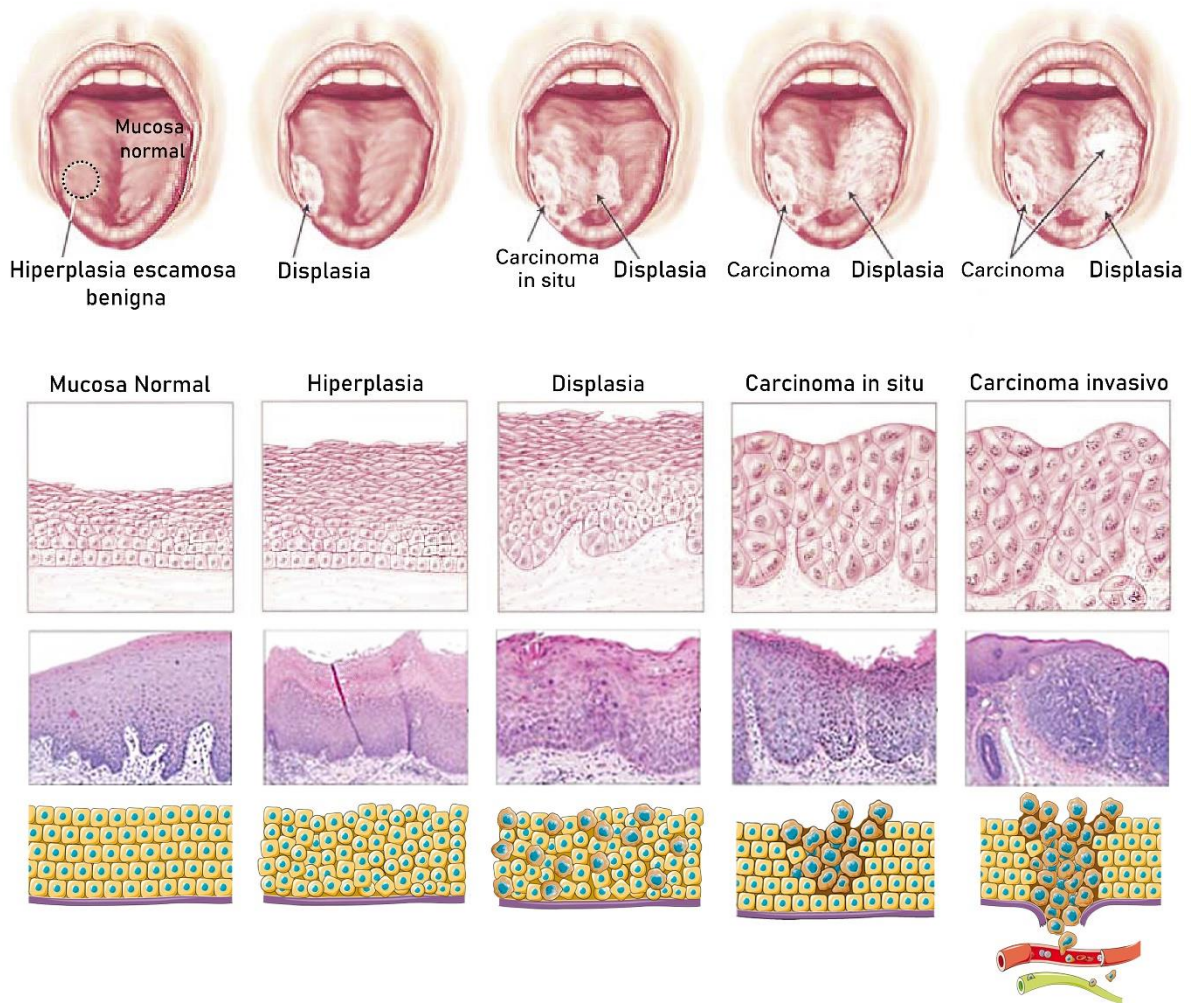


Figura 5. Progressão patológica; clínica e histológica do câncer da cavidade bucal. Da mucosa normal para uma hiperplasia e a evolução da mesma para displasia, carcinoma in situ e finalmente para carcinoma invasivo (bem diferenciado) sucessivamente. Fontes: PubMed "Head and neck câncer" , "A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral câncer". Site: "<https://smart.servier.com/>". Adaptado.

2.1.2 Fatores de risco

2.1.5.1 Tabaco e alcoolismo

A combinação de tabaco e álcool é de longe o principal fator de risco. Para o tabaco, o risco de desenvolver CCO aumenta com a duração da exposição. Por outro lado, após 20 anos de cessação, o risco não é mais significativamente diferente dos não fumantes (53). O tabaco de mascar também é um fator cancerígeno, em particular com a adição da noz bétel, o CCO evidencia ser a neoplasia maligna mais comum no Sul Asiático e nas regiões da Asia Oriental (2), mediante dos hábitos regionais de mastigar noz de bétel (51), que dá localizações preferencialmente ao nível da face interna das bochechas ou dos lábios (53).

O álcool não parece desempenhar um papel carcinogênico direto, mas sim de potencializador do tabaco uma vez que o CCO apresenta etiologia multifatorial, diante do seu desenvolvimento associado ao tabagismo com ou sem fumaça e o consumo excessivo de álcool, esses fatores atuam isoladamente ou sinergicamente (20, 62), uma vez que o etanol induz a atrofia do epitélio oral, promovendo a penetração e a solubilização dos metabólitos carcinogênicos do tabaco. O acetaldeído, o primeiro metabólito do etanol, foi descrito como carcinogênico em animais e destaca seu possível papel carcinogênico (63).

2.1.5.1 Fatores nutricionais

Deficiências de vitaminas parecem estar envolvidas na ocorrência de CCP. Frequentemente encontradas em pacientes alcoólatras crônicos, as deficiências de vitamina C e A podem ter um papel na ocorrência de câncer. A deficiência de ácido retinóico levaria a uma anomalia na maturação do tecido epitelial, favorecendo a ocorrência de câncer. Por outro lado, o consumo de frutas e hortaliças tem sido apontado como fator de proteção. Mesmo que sejam relativas, as ações antioxidante, antiproliferativa e imunoestimulante podem ter um papel na redução do risco de CCO (53, 63).

2.1.5.1 Papilomavírus Humano (HPV - Human Papillomavirus)

Cada vez mais, os tumores que surgem na cavidade oral, estão ligados à infecção prévia com cepas oncogênicas do HPV (64, 65). O papel carcinogênico do HPV 16 e 18 no desenvolvimento de certos cânceres de cabeça e pescoço é agora aceito (66-69). De fato, 15 a 20% dos cânceres de cabeça e pescoço afetam adultos jovens que não bebem e não fumam, o que pode estar relacionado à infecção pelo HPV. A incidência de infecções por HPV em CCP também é inversamente proporcional ao consumo de álcool e tabaco (70). No entanto, o papel do HPV no CCO parece referir-se apenas a uma minoria de casos. O estudo da expressão da proteína P16 ou dos transcritos dos oncogenes E6 e E7 são o padrão ouro atual para detecção da infecção pelo HPV. O número de cânceres da cavidade oral (CsCO) ligados ao HPV parece, em última análise, muito limitado e parece afetar apenas uma proporção muito pequena deles (71, 72). O papel do HPV parece estar envolvido principalmente em cânceres de orofaringe e mais particularmente de amígdala com mais de 80% dos cânceres de orofaringe positivos para HPV de acordo com estudos (73).

2.1.5.1 Lesões potencialmente cancerizáveis (LPC)

O desenvolvimento do CCO é um processo de várias etapas, incluindo alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas. Entretanto os CsCO aparecem na maioria das vezes acompanhando a evolução da displasia causada pela exposição ao álcool e tabaco. Contudo alguns tipos de câncer, que se classificam como CCEO, desenvolvem-se a partir de lesões e condições pré-malignas (74). Todavia, a proporção de CCO secundário, às chamadas “Lesões potencialmente cancerizáveis” é estimada em quase 20% (53, 75). A OMS definiu LPC como “tecido morfológicamente alterado no qual o câncer ocorre com mais frequência do que em tecido autólogo normal”. LPC são doenças crônicas da mucosa oral que podem ser regressivas, mas requerem monitoramento regular a longo prazo (1, 75).

A principal razão para a apresentação tardia da doença é o desconhecimento das lesões por parte dos pacientes ou médicos. Isso também se deve ao desconhecimento das LPCs e de suas aptidões em se desenvolver em um câncer bucal. Os programas de educação

em saúde destinados a motivar os pacientes para o diagnóstico precoce têm falhado em grande parte devido à compreensão incompleta da doença (76). Uma biópsia inicial é recomendada para confirmar o diagnóstico. Este gesto deve ser repetido no caso de uma modificação recente ou na menor dúvida de degeneração maligna. As lesões que entram na classificação de LPC são (75) a seguir:

2.1.5.1 Leucoplasia

De acordo com a definição da OMS, a leucoplasia é uma mancha ou placa branca indolor da mucosa oral, não removível ao coçar, correspondendo à hiperqueratose (77). Existem principalmente duas formas clínicas: a forma homogênea bem circunscrita e a forma não homogênea que apresenta maior risco de transformação maligna (Figura 6). A intoxicação por tabagismo é a principal causa, o tabaco sem fumaça está associado ao desenvolvimento de leucoplasia em 8,4% dos casos (78), e sua interrupção pode permitir a regressão completa das lesões (79, 80). Clinicamente, a leucoplasia apresenta-se em diferentes visões, incluindo leucoplasia verrucosa fina, espessa ou homogênea, granular ou nodular e proliferativa (81).

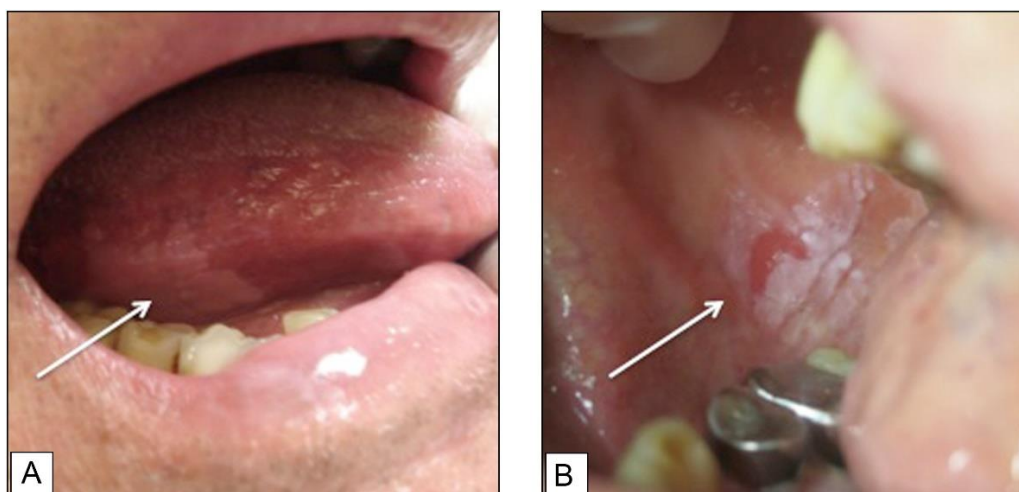


Figura 6. Leucoplasia homogênea da borda lateral da língua à direita (A). Leucoplasia não homogênea da face interna da bochecha direita (B) (Acervo Dr M. Samimi, CHU de Tours). Fonte: PubMed “Oral cancers: risk factors and management Oral cancer: Risk factors and management”.

O risco de transformação maligna aumenta significativamente entre pessoas de 60 a 70 anos (82). Leucoplasias no assoalho da boca, língua lateral e lábio inferior, apresentam maior

número de classificações para displasia ou transformação maligna (82, 83). Os possíveis fatores de risco para transformação maligna são, leucoplasia idiopática (em não fumantes), maior que 200 mm², longa duração, tipo não homogêneo, presença de espécies de candida e displasia epitelial (84). Localização na língua e/ou assoalho da boca que a leucoplasia oral com displasia apresenta maior risco de taxa de transformação maligna em relação à leucoplasia oral sem displasia (85). A leucoplasia pontilhada (lesões brancas ou manchas nodulares brancas intercaladas com regiões eritematosas) e a leucoplasia erosiva estão frequentemente associadas à displasia ou carcinoma epitelial (86, 87). Leucoplasia não tem característica histopatológica específica e é apenas um termo clínico (88). No entanto, os achados histopatológicos são hiperqueratose com ou sem displasia epitelial (Figura 7).

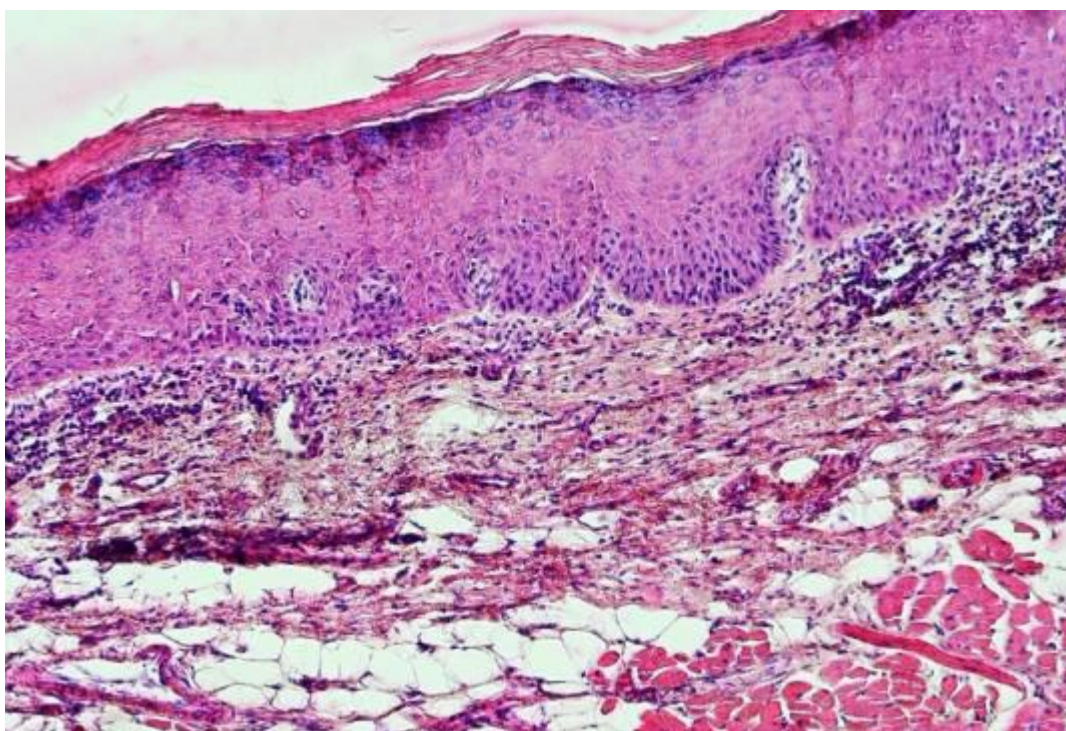


Figura 7. Imagem histológica de uma lesão leucoplásica mostrando displasia epitelial leve. (H & E, X 40). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”

A displasia epitelial é dividida em três subclassificações: leve, moderada e grave (89). Outras lesões orais brancas, como ceratoses friccionais, morsicatio buccarum, não são consideradas leucoplasias, pois não são lesões pré-malignas e são reversíveis após a eliminação dos fatores etiológicos suspeitos. Além disso, outras lesões brancas orais, como candidíase, líquen plano, leucedema, não devem ser consideradas como leucoplasia, pois possuem características microscópicas específicas (81). O tratamento é baseado em monitoramento anual ou excisão

em caso de alteração recente ou aparência suspeita. O risco de alteração maligna em CCEO é estimado entre 5 a 20% de todos os casos, e ocorre após uma evolução ao longo de vários anos (79, 80).

2.1.5.1 Leucoplasia proliferativa verrucosa

Anteriormente chamada de papilomatose oral florida, é uma lesão áspera, mas flexível à palpação, que acomete preferencialmente idosos (Figura 8). A aparência pode variar de um simples papiloma benigno a uma extensa placa papilomatosa. Sua evolução para carcinoma verrucoso ou mesmo carcinoma espinocelular invasivo é quase sistemática. O tratamento por excisão iterativa é geralmente necessário. A cura é rara e difícil (90-92).

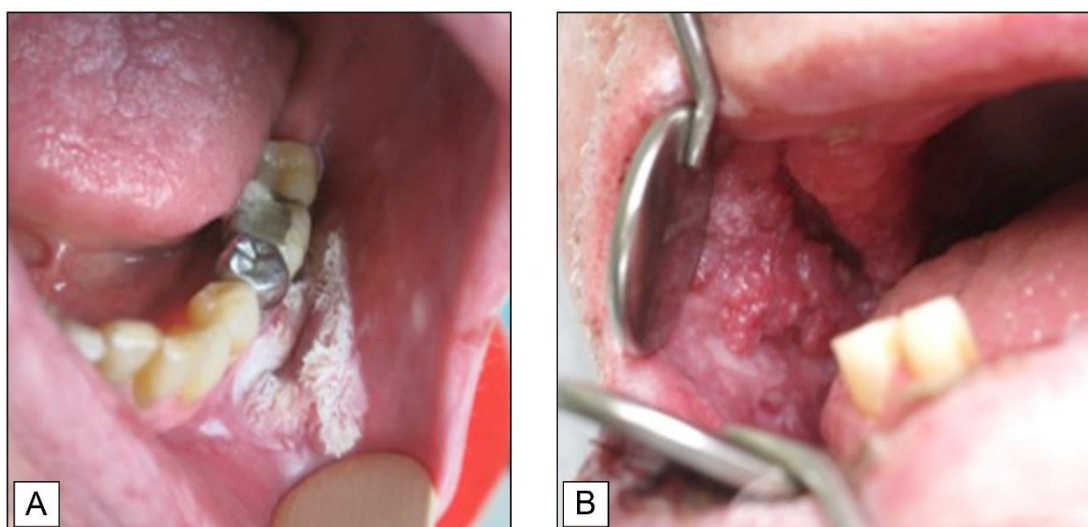


Figura 8. Leucoplasia verrucosa perfilada do vestibulo inferior esquerdo (A). Degeneração em carcinoma verrucoso (B) (Coleção Dr. M. Samimi, Hospital Universitário de Tours). Fonte: PubMed “Oral cancers: risk factors and management Oral cancer: Risk factors and management”.

2.1.5.1 Líquen plano oral

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica, evoluindo em surtos e de etiologia pouco conhecida (Figura 9). A causa autoimune mediada por células é a causa geralmente aceita. Esta doença é marcada por fases de ataques inflamatórios e quiescência (93). A OMS considera o LPO como uma lesão potencialmente cancerizável especialmente na presença de displasia (94). As lesões de líquen oral são brancas fora dos focos e podem ser limitadas em manchas ou mais extensas em folhas.

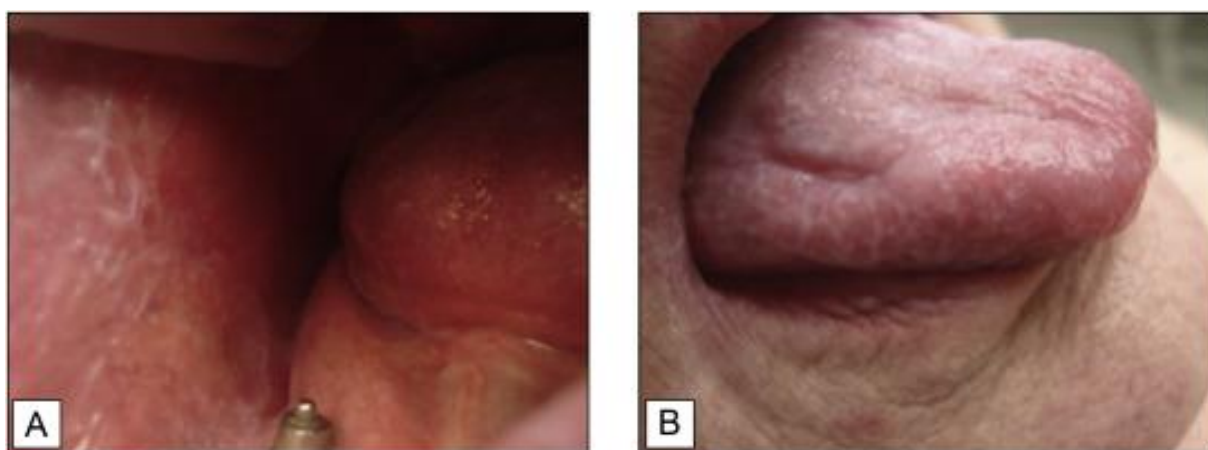


Figura 9. Extenso líquen plano da face interna da bochecha (A) e da borda lateral da língua (B) (Acervo Dr M. Samimi, CHU de Tours). Fonte: PubMed “Oral cancers: risk factors and management Oral cancer: Risk factors and management”.

Essas lesões podem ter vários aspectos, sendo os mais frequentes as formas circinada, reticular ou dendrítica. As formas eritematosa, erosiva ou bolhosa refletem um ataque inflamatório, enquanto as formas atrófica, hiperqueratótica, pigmentada ou hipertrófica são observadas em líquens antigos ou no estado pós-líquen correspondente a fibrose irreversível da mucosa. O risco de degeneração maligna é raro e é estimado em cerca de 5%. A presença de uma infiltração bem definida de células inflamatórias predominantemente linfócitos, degeneração hidrópica da camada basal epitelial e ausência de displasia epitelial (Figura 10) são os critérios histopatológicos para o diagnóstico de LPO (95). O tratamento do líquen é baseado na corticoterapia local ou mesmo geral durante os surtos inflamatórios, bem como no monitoramento regular (96).

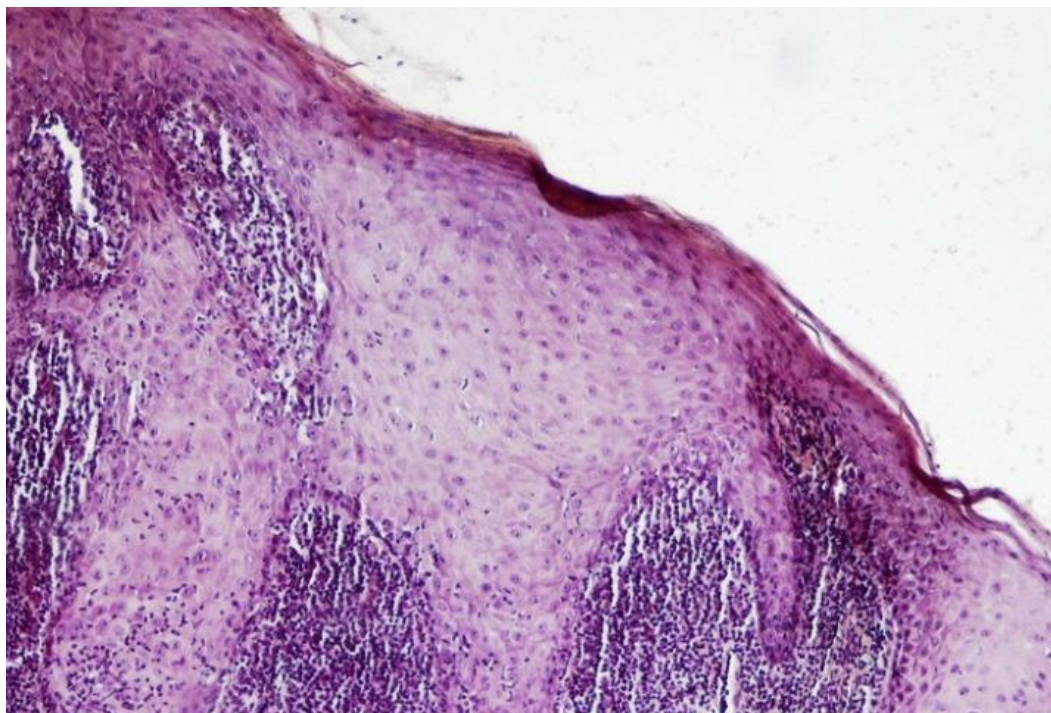


Figura 10. Imagem histológica de uma lesão de líquen plano mostrando acantose, retículos em forma de dente de serra e infiltração em forma de faixa de linfócitos imediatamente subjacentes ao epitélio. (H & E, X 400). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Displasia liquenóide

O termo displasia liquenóide (DL) foi introduzido em 1985, utilizado em casos de estomatite liquenóide com displasia. A etiopatogenia do DL é diferente da do LPO. No LPO, a infiltração liquenóide representa a resposta imune mediada por células provocada por diferentes antígenos, enquanto no DL, a infiltração liquenóide ocorre contra células epiteliais atípicas (97). A displasia liquenóide aparece principalmente como uma área eritematosa ou leucoplásica na mucosa bucal ou gengiva e não é uma lesão simétrica como pode ser encontrada no LPO. Os achados microscópicos dessas lesões consistem em hiperparaceratose ou hiperortoceratose, displasia epitelial e infiltração linfocitária (Figura 11). A hiperplasia e atipia das células basais, em vez de degeneração, é a característica histológica importante (98). A falta de degeneração por liquefação e a camada de células basais intacta ou mesmo hiperplásica é uma das principais características distintivas de DL de LPO (97, 99).

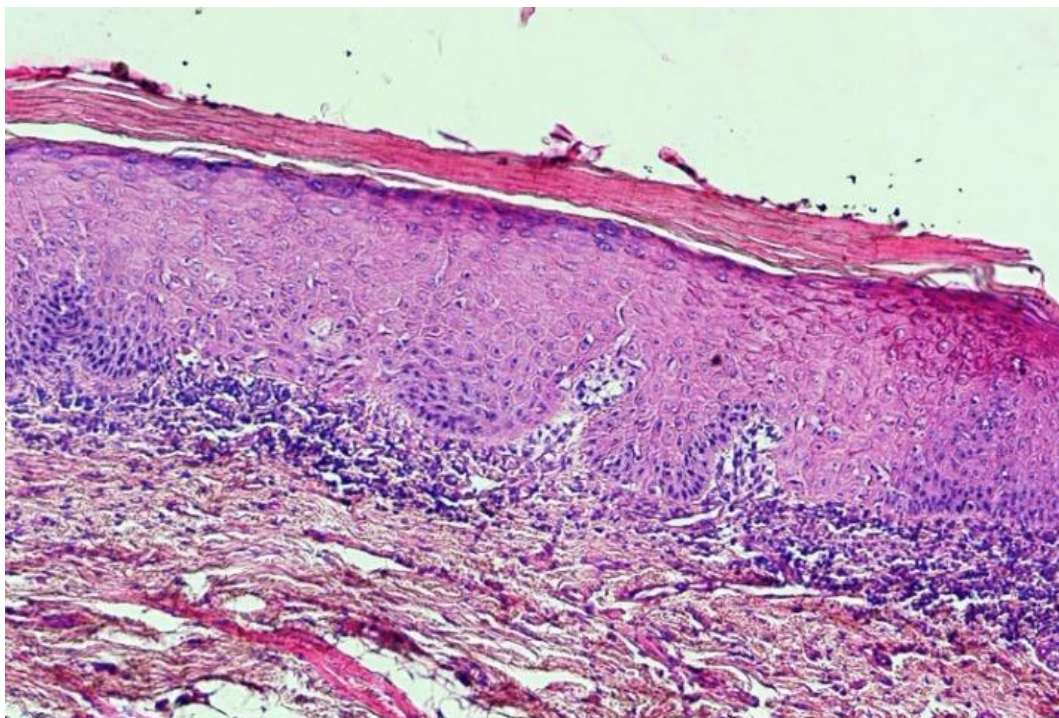


Figura 11. Imagem histológica mostrando displasia epitelial leve, hiperortoceratose de superfície e mucosite liquenóide. (H & E, X 40). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Lúpus Eritematoso Discóide Crônico (LEDC)

LEDC é uma forma crônica de lúpus cutâneo, que se apresenta clinicamente como uma placa eritematosa, escamosa e despigmentada (100). A área da cabeça e pescoço é afetada em 41% de todos os casos (101). As lesões orais são distribuídas assimetricamente afetando o palato, mucosa bucal e língua. A mucosa bucal pode ser afetada em 15% dos pacientes e pode se transformar em leucoplasia (102). As características microscópicas incluem hiperqueratose, degeneração da camada basal e infiltração linfocítica subepitelial. Infiltração inflamatória profunda, muitas vezes perivascular, as lesões de LEDC distingue das lesões de LPO (103) (Figura 12).

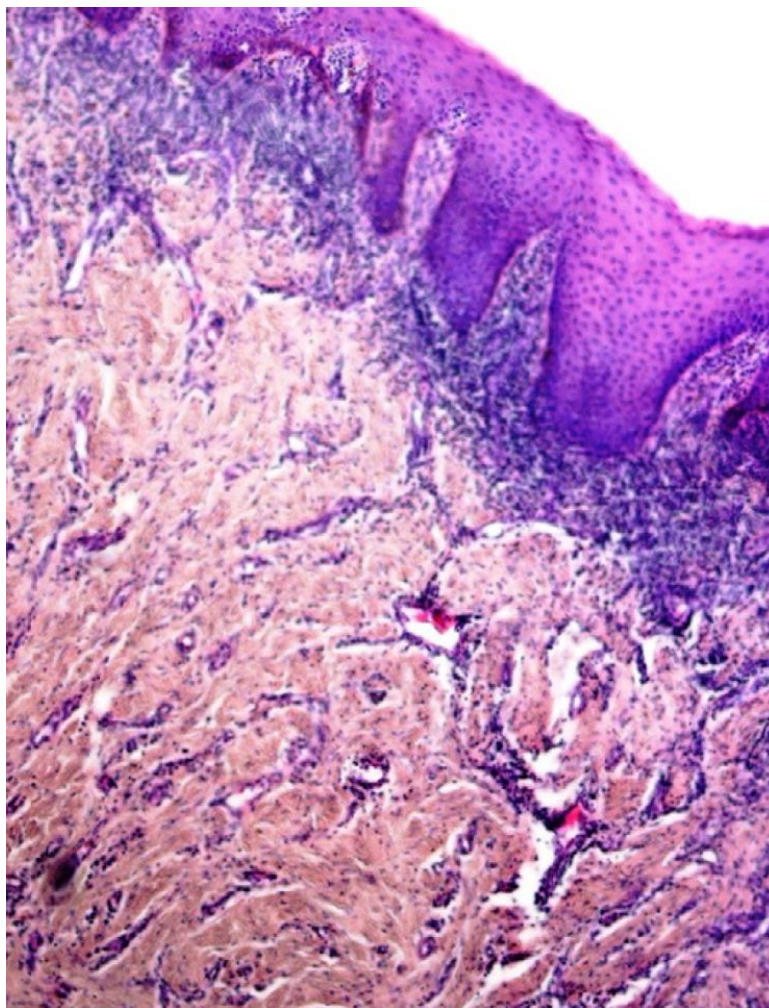


Figura 12. Imagem histológica de uma lesão de lúpus eritematoso discoide crônico mostrando hiperparaceratose e padrão liquenóide de inflamação. (H & E, X 40). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Eritroplasia

A eritroplasia geralmente acomete os idosos, clinicamente as lesões se caracteriza por uma área aveludada, vermelho-vivo, uniforme, com bordas claras, muitas vezes muito extensa e indolor, que não pode ser classificada como qualquer outra condição clínica e histopatologicamente (77, 104-106). O risco de degeneração desse tipo de lesão é alto e envolve a excisão quando possível (104-106). A mutação da proteína tumoral (Tumor Protein (p53)) foi detectada em 46% das eritroplasias orais (107). As características histopatológicas

incluem a ausência de excesso de queratinização superficial, apresentando algum grau de displasia, carcinoma *in situ* ou CCEO (108, 109) (Figura 13).

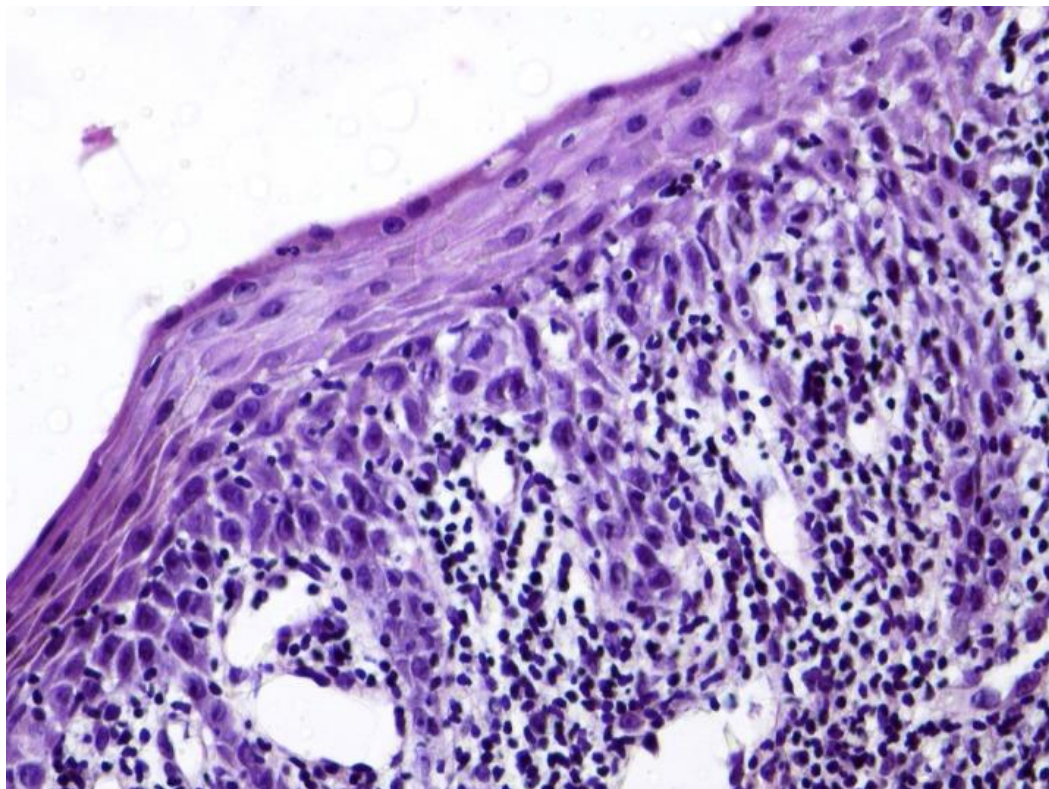


Figura 13. Imagem histológica mostrando epitélio oral atrófico com atipia, descamação da camada basal e inflamação crônica subjacente em uma eritroplasia clinicamente diagnosticada. (H & E, X 400). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Hiperplasia verrucosa oral

A hiperplasia verrucosa oral (HVO) aparece como uma placa ou nódulo branco ou rosa único ou multifocal com superfície verrucosa ou papilar, assemelhando-se a uma grande verruga. Este termo pode ser usado como uma característica clínica ou histopatológica (110). A displasia moderada é predominante que a displasia leve e está correlacionada com o consumo de diferentes preparações de tabaco (111). A HVO pode desenvolver uma malignidade, principalmente CCEO e em menor número um carcinoma verrucoso (112).

As características histopatológicas incluem projeções nítidas e ceratóticas com invaginações cheias de queratina sem núcleos fibrovasculares óbvios (Figura 14). Nunca se estende abaixo do epitélio normal adjacente. Displasia leve associada a reação inflamatória liquenóide/interface também pode ser observada. Em 68% dos casos pode ser observada infiltração de células inflamatórias intensas incluindo linfócitos, plasmócitos e histiócitos (113). Crescimento lateral e descendente, cristas rete alargadas e semelhantes a bulbos são formadas. Se ocorrer uma invasão de frente ampla, ela pode ser designada como carcinoma verrucoso. Um carcinoma verrucoso pode ser diferenciado de uma hiperplasia verrucosa por um contraforte periférico e extensão abaixo da borda inferior do epitélio normal (114).

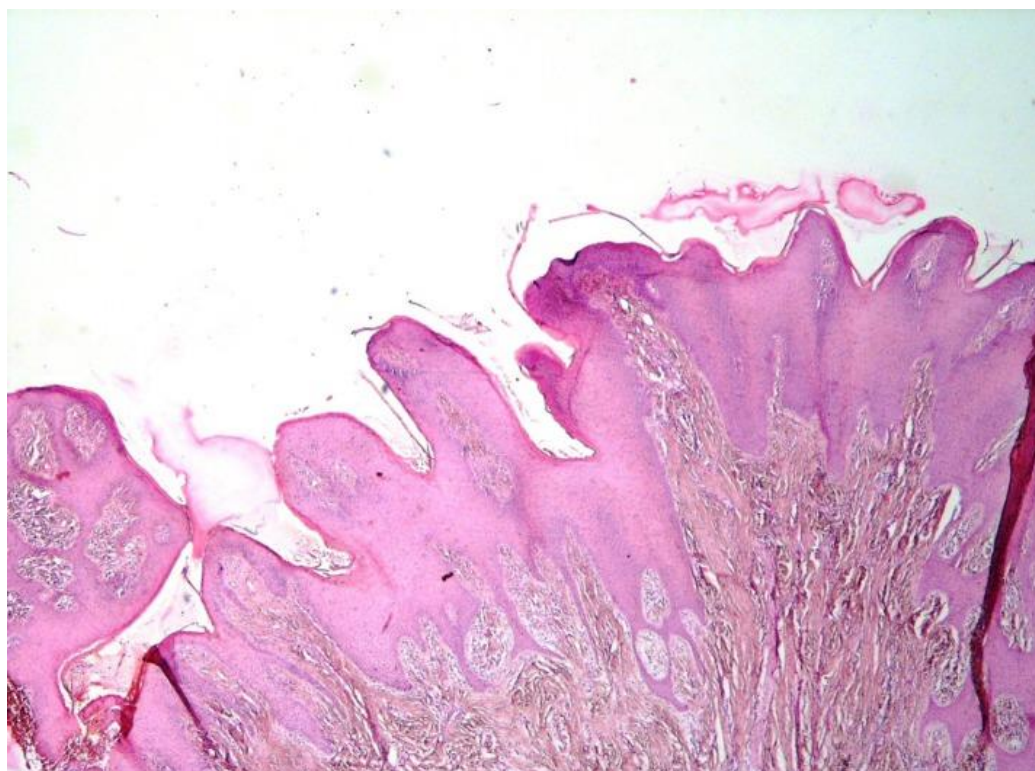


Figura 14. Imagem histológica de uma lesão clinicamente verrucosa mostrando proliferação epitelial. (H & E, X 40). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Ceratose actínica labial

A ceratose actínica labial (CAL), é secundária à exposição crônica aos raios ultravioleta (UV) (115), especificamente radiação UV-B que causa mutação no gene p53, outros entre os principais fatores é o consumo do tabagismo e os fator etiológico, que incluem pele e olhos claros (116). Muitas das lesões de CAL são assintomáticas, geralmente como pápulas eritematosas ou placas em áreas expostas ao sol. Pode regredir ou progredir para um carcinoma de células escamosas invasivo. CAL é a forma inicial de carcinoma de células escamosas *in situ* (117, 118). Algumas características clínicas como endureção, inflamação, diâmetro maior que 1 cm, aumento rápido, sangramento, eritema e ulceração sugerem um risco aumentado para transformação maligna (119). Sua aparência descamativa reativa inicial progride então para hiperqueratose fissurada (Figura 15). Localizada principalmente ao nível do lábio inferior, esse tipo de lesão geralmente aparece após 45 anos. O tratamento baseia-se na cessação do tabagismo e excisão em caso de lesão persistente (vermilionectomia) (120).



Figura 15. Ceratose actínica labial inferior com foco de carcinoma espinocelular paramediano *in situ* (Coleção Dr A. Paré, Hospital Universitário de Tours). Fonte: PubMed “Oral cancers: risk factors and management Oral cancer: Risk factors and management”.

O diagnóstico das lesões é baseado no exame clínico e dermatoscópico, porém em algumas situações o exame histopatológico é necessário, para a confirmação e posterior tratamento, já que seu potencial risco de transformação em CCEO. As características histopatológicas da CAL incluem uma espessura atrófica ou acantótica ou mesmo normal da

epiderme. A variante acantótica é caracterizada por cristas rete alongadas. O queratinócito atípico é a característica patognomônica, que começa dentro das células da camada basal. Em estágios avançados, a atipia dos queratinócitos se estende acima da camada basal (121) (Figura 16).

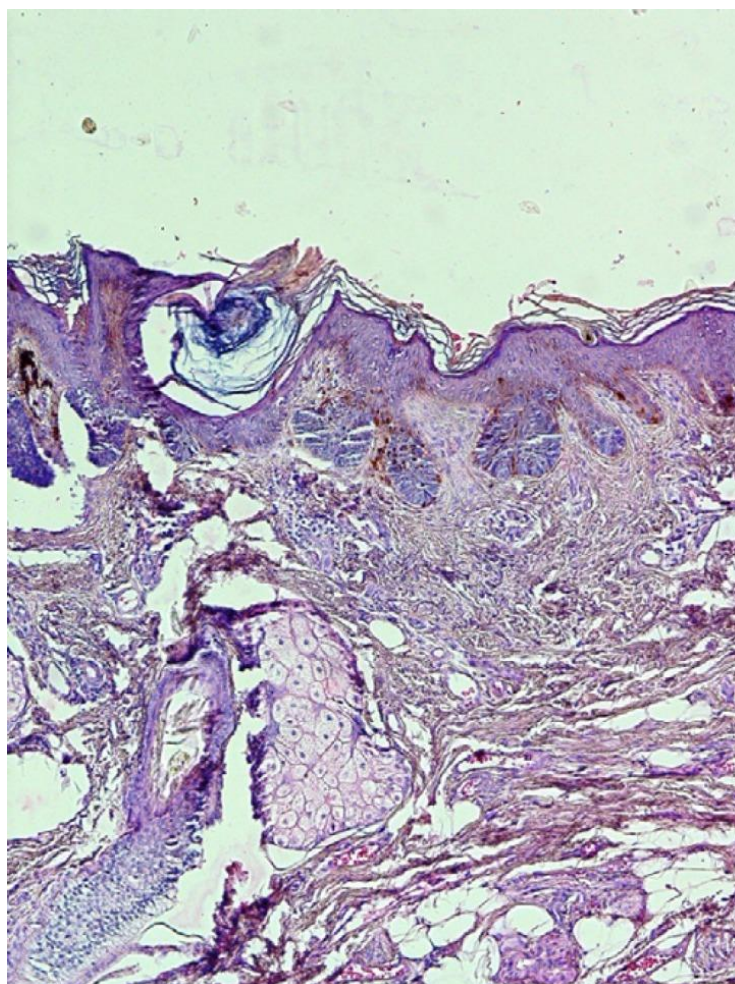


Figura 16. Imagem histológica de uma ceratose actínica mostrando hiperqueratose superficial e acantose. (H & E, X 40). Fonte: PubMed “Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis”.

2.1.5.1 Outros fatores de risco

O baixo nível socioeconômico, autonegligência e deficiência educacional, também tem mostrado ser um dos principais fatores contribuintes para a ocorrência do CCEO (122). Outro

fator que levar a uma elevada taxa de morte é devido aos pacientes portadores do CCEO apresentarem para diagnóstico e posterior tratamento, em uma fase tardia da doença. Estudos mostram que a proporção de pacientes que procuram um profissional da saúde quando a doença está avançada, não mudou em um intervalo de tempo referente a 40 anos, mesmo diante da educação pública (123, 124).

2.1.3 Aspecto clínico

Na maioria dos casos, o desenvolvimento do CCO ocorre após a evolução da displasia para carcinoma *in situ*, progredindo para carcinoma espinocelular infiltrante. A apresentação usual é a de uma lesão ulcerada, em brotamento, sangrando em contato com um endurecimento perilesional correspondente à infiltração submucosa do tumor (figura 16). A aparência às vezes pode ser enganosa, especialmente nas formas nodulares com pouca ulceração ou aquelas que são principalmente nas submucosas. Nas localizações gengivais, assim como no palato ou na comissura intermaxilar, o envolvimento ósseo é muitas vezes precoce devido à contiguidade anatômica. Na porção denteada, o acometimento ósseo pode ser responsável pela mobilidade dentária. Às vezes, um trismo pode estar presente. Reflete a infiltração dos músculos mastigatórios (pterigóides mediais) principalmente nas localizações da comissura intermaxilar ou no assoalho posterior da boca. A otalgia reflexa também é um sintoma que pode ser encontrado nas localizações posteriores da cavidade oral (51, 125-127).

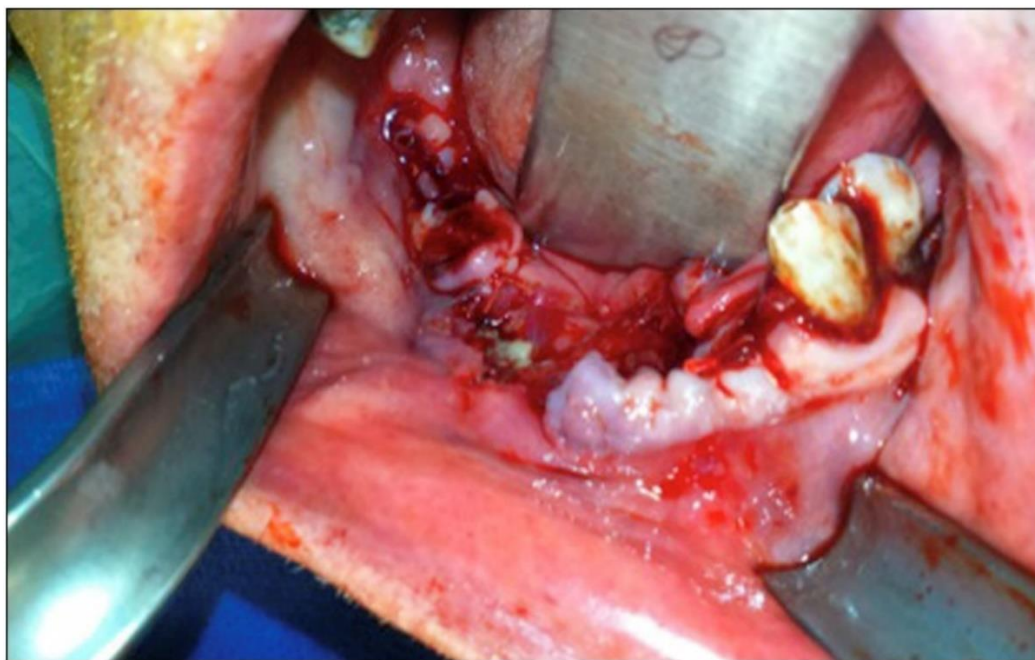


Figura 17. Carcinoma espinocelular da gengiva mandibular direita estendendo-se até a comissura intermaxilar (Coleção Dr A. Paré, Hospital Universitário de Tours). Fonte: PubMed “Oral cancers: risk factors and management Oral cancer: Risk factors and management”.

2.1.4 Classificação clínica / Estadiamento

Independente do estágio em que o câncer é descoberto, há uma importância de se classificar cada caso de acordo com a extensão do tumor, isso é fundamental para determinar os meios mais eficazes de tratamento. O método utilizado para essa classificação é chamado de estadiamento e sua importância está na constatação de que a evolução da doença é diferente quando ela está restrita ao órgão de origem ou quando se estende a outros órgãos. Esse estadiamento pode ser categorizado como clínico (Quadro 1) e patológico (Quadro 2). Estadiar um caso de neoplasia maligna significa avaliar o seu grau de disseminação. Para tal, há regras internacionalmente estabelecidas, que estão em constante aperfeiçoamento (128).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos (Classification of Malignant Tumours). Esse sistema se baseia na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou a ausência de metástases a distância (M).

TNM - Classificação Clínica	
T	Tumor primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	(Lábio) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)
T4a	(Cavidade oral) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
T4b	(Lábio e cavidade oral): Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
Nota:	A erosão superficial isolada do osso/alvéolo dentário por um tumor primário de gengiva não é suficiente para classificá-lo como T4.
Linfonodos Regionais	
N	Linfonodos Regionais
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
Nota:	Os linfonodos de linha média são considerados linfonodos homolaterais.
Metástase à Distância	
M	Metástase à Distância
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
Resumo Esquemático	
Lábio, Cavidade Oral	
T1	< 2 cm
T2	> 2 até 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Lábio: invade cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, pele. Cavidade oral: invade cortical óssea, músculos profundos extrínsecos da língua, seios maxilares, pele.
T4b	Espaço mastigador, lâminas pterigóides, base do crânio, artéria carótida interna
N1	Homolateral, único, < 3 cm
N2	(a) Homolateral, único, > 3 até 6 cm (b) Homolateral, múltiplo, < 6 cm (c) Bilateral, contralateral, < 6 cm
N3	> 6 cm

Quadro 1. Sistema de estadiamento preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM - Classificação Clínica. (Adaptado). Fonte: União Internacional Contra o Câncer / 6ª edição, 2004 / Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.

Esses parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4; de N0 a N3; e de M0 a M1, respectivamente. O estágio de um tumor reflete não apenas a taxa de crescimento e a

extensão da doença, mas também o tipo de tumor e a sua relação com o hospedeiro. Assim, além do TNM, a classificação das neoplasias malignas deve considerar também: localização, tipo histopatológico, produção de substâncias e manifestações clínicas do tumor, além de sexo, idade, comportamentos e características biológicas do paciente (129).

p TNM - Classificação Patológica			
As categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.			
pN0	<p>O exame histológico do espécime de um esvaziamento cervical seletivo incluirá, geralmente, 6 ou mais linfonodos. O exame histológico do espécime de um esvaziamento cervical radical ou modificado incluirá, geralmente, 10 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado seja não encontrado, classifica-se como pN0. Quando o tamanho for um critério para a classificação pN, mede-se a metástase e não o linfonodo inteiro.</p>		
Gradação Histopatológica			
As seguintes definições das categorias G aplicam-se a todas as localizações da cabeça e do pescoço, exceto à tireóide:			
G	Gradação Histopatológica		
GX	O grau de diferenciação não pode ser avaliado.		
G1	Bem diferenciado		
G2	Moderadamente diferenciado		
G3	Pouco diferenciado		
G4	Indiferenciado		
Grupamento por Estádios			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3 N0,	N1	M0
Estádio IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b Qualquer	N	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Quadro 2. Sistema de estadiamento preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM - Classificação Patológica. Fonte: União Internacional Contra o Câncer / 6ª edição, 2004 / Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. (Adaptado).

2.1.5 Tratamento

Os principais objetivos do tratamento são: cura, prolongamento da vida e melhora da qualidade de vida. Há tratamentos curativos para um terço de todos os casos de câncer, especialmente para câncer de mama, câncer do colo do útero, câncer da cavidade oral (boca) e câncer de cólon e reto (intestino), no entanto só se obtém resultados satisfatórios quando

são detectados precocemente e tratados de acordo com as melhores técnicas e métodos clínicos. Na atualidade há três métodos principais de tratamento no combate do câncer, são essas a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A radioterapia implica em um método de tratamento local ou locorregional do câncer, o que por sua vez utiliza equipamentos e técnicas variadas para irradiar áreas do corpo humano, prévia e cuidadosamente demarcadas. Os propósitos da radioterapia referem-se a pacientes adultos, virtude de, em crianças e adolescentes, emprega cada vez menos a radioterapia, em razão dos efeitos colaterais tardios no desenvolvimento orgânico o qual este acarreta. As categorias das radioterapias são:

- A Radioterapia curativa: onde a sua principal modalidade de tratamento radioterápico; visa à cura do paciente.

- A Radioterapia pré-operatória (prévia ou citorrredutora): procedimento prévio a principal modalidade de tratamento, ou seja, a cirurgia, para reduzir o tumor e facilitar o procedimento operatório.

- Radioterapia pós-operatória ou pós-quimioterapia (profilática): segue-se à principal modalidade de tratamento, com o alvo de esterilizar possíveis focos microscópicos do tumor.

- Radioterapia paliativa: determinada no tratamento local do tumor primário ou de metástase, sem influenciar a taxa da sobrevivência global do paciente. É usada principalmente nas seguintes circunstâncias:

- Radioterapia antiálgica: modalidade de radioterapia paliativa com a finalidade específica de reduzir a dor.

- Radioterapia anti-hemorrágica: modalidade de radioterapia paliativa com a finalidade específica de controlar os sangramentos.

Já a quimioterapia é a modo de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados “quimioterápicos” (ou antineoplásicos) administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos. O intuito da quimioterapia implica à:

- Quimioterapia prévia, neoadjuvante ou citorrredutora: indicada para a redução de tumores locais e regionalmente avançados que, no momento, são irresssecáveis ou não. Este tem a finalidade de tornar os tumores ressecáveis ou de melhorar o prognóstico do paciente.

- Quimioterapia adjuvante ou profilática: indicada após o tratamento cirúrgico curativo, quando o paciente não apresenta qualquer evidência de neoplasia maligna detectável por exame físico e exames complementares.

- Quimioterapia curativa: com o propósito de curar pacientes com neoplasias malignas para os quais representa o principal tratamento (podendo ou não estar associada à cirurgia e à radioterapia).
- Quimioterapia para controle temporário de doença: indicada para o tratamento de tumores sólidos, avançados ou recidivados ou neoplasias hematopoéticas de evolução crônica. Pois este permite longa sobrevida (meses ou anos), mas sem possibilidade de cura; no entanto a possibilidade no aumento da sobrevida do doente.
- Quimioterapia paliativa: indicada para a palição de sinais e sintomas que comprometem a capacidade funcional do paciente, mas não repercute, obrigatoriamente, na sua sobrevida. Independente da via de administração, é de duração limitada, tendo em vista a incurabilidade do tumor (doença avançada, recidivada ou metastática), que tende a evoluir a despeito do tratamento aplicado.

Estes tratamentos podem ser usados isoladamente ou em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à melhor sequência de sua administração. No momento atual, poucas são as neoplasias malignas tratadas com apenas uma modalidade terapêutica (128).

Mesmo com a evolução nos avanços científicos para as diversidades formas de tratamento para o CCO, as taxas de mortalidade advindas do agravamento do quadro clínico principalmente para os casos diagnosticados com CCEO ainda permanece altas devido a sua particularidade no rápido crescimento, invasividade e metástase à distância (130-137). Posto isto a exploração de novos mecanismos terapêuticos no combate contra o CCEO é imprescindível para o conhecimento científico, a fim de conceder comodidade, saúde e bem estar aos portadores enfermos do CCO.

2.1.5.1 Implicações pós-tratamentos

Contabilizasse que 90% dos sobreviventes de CCO experimentam taxas inusitadamente altas de sintomas de impacto nutricional (SIN) na sobrevivência como resultado da localização do tumor e tratamentos agressivos com radiação na região da cabeça e pescoço. Vivenciando uma série de sintomas que afetam a capacidade e o desejo de comer. Os SIN são frequentemente crônicos e persistem além da conclusão do tratamento ou podem se desenvolver como efeitos colaterais tardios (138).

Embora haja melhorias notáveis na sobrevivência com o tratamento com altas doses de radiação (16), esses protocolos contribuem para uma carga significativa de SIN durante e após o tratamento (17). Refere-se a quaisquer efeitos adversos ou sintomas que comprometam a capacidade e/ou o desejo de comer e beber, incluindo; disfagia, trismo, xerostomia, dificuldade de mastigação, mucosite, e alterações de sabor (15). Embora seja possível que os SIN agudo resolva após o tratamento, o SIN pode continuar por meses, ou mesmo anos após a conclusão do tratamento, e se tornar um problema crônico de saúde. (15, 18). Os SIN crônico podem ter efeitos potencialmente devastadores no bem-estar geral dos sobreviventes, pois a capacidade alimentar pode nunca voltar ao normal, forçando os sobreviventes a fazer adaptações e reaprender a comer (18). Além da dificuldade de alimentação física, também podem existir desafios psicológicos e sociais, dada a importância da alimentação no dia a dia (17).

A maioria dos pacientes com CCO é tratada com quimiorradioterapia concomitante, que está associada a taxas mais altas de efeitos tóxicos e complicações relacionadas ao tratamento em comparação com outras modalidades de tratamento, como cirurgia ou radiação isolada (139). Muitas vezes, causa uma deterioração da função de deglutição, inibindo a conversão de alimentos líquidos para semi-sólidos/sólidos (140). Embora a maioria dos eventos adversos após o tratamento com quimiorradioterapia ocorra durante a fase aguda, alguns podem não ser resolvidos, resultando em desafios crônicos permanentes (139, 140).

Assim sendo, problemas funcionais associados à alimentação podem permanecer por anos após o tratamento, levando ao comprometimento da nutrição e da qualidade de vida do paciente. A investigação, sucessiva da descoberta de novos meios de tratamentos, afim de serem usadas isoladamente ou associadamente aos tratamentos convencionais com interesse de amenizar os impactos pós-tratamento, são indispensáveis no intuito de proporcionar melhor qualidade de vida aos sobreviventes do CCEO.

2.1.6 Elementos contribuintes para complicações do CCEO.

Níveis elevados de determinados componentes do SRA têm demonstrado ser um fator contribuinte para complicações do CCO, entre esses componentes está a Ang II, que por sua vez é o produto da ação proteolítica da ECA sobre o peptídeo precursor, Ang I, provaram cientificamente que além de suas propriedades vasoativas, a Ang II é capaz de estimular a angiogênese e atuar como mitógeno, promovendo a proliferação celular. Recentemente,

surgiram evidências de que a Ang II também é capaz de promover a invasão tumoral, uma etapa chave na cascata metastática, embora os mecanismos pelos quais isso ocorra permaneçam obscuros (141-143). Além disso, outro estudo evidencia que a Ang II é capaz de promover a invasão e migração de do CCEO tanto de forma autócrina quanto por desencadear interações tumor-parácrinas estromais. Os efeitos da Ang II nas vias de sinalização autócrinas e parácrinas são mediados pelo AT1R. Esses dados demonstram o papel do sistema renina-angiotensina na carcinogênese oral e levantam a possibilidade de utilizar antagonistas e/ou inibidores do AT1R como novos agentes terapêuticos no CCO (144).

2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O SRA é a principal via endócrina envolvida na regulação da função cardiovascular, renal e neuroendócrina (22-24, 145). É o principal regulador fisiológico da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico na manutenção da homeostase. A hiperativação do SRA é o principal fator de hipertensão, e os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRAs) e os IECAs são muito eficazes no controle da hipertensão e doenças cardiovasculares (146). A Ang II é o principal hormônio efetor, exercendo seus efeitos celulares, predominantemente pelo receptor de sinalização, o AT1R, e sua atividade biológica tem sido alvo para o desenvolvimento farmacológico de inibidores (147, 148). A Ang II é um potente hormônio vasopressor e um regulador primário da secreção de aldosterona (149); é também um importante regulador da pressão sanguínea e do volume no sistema cardiovascular. Na hipertensão, a ativação aumentada do AT1R e a sinalização celular levam a uma extensa remodelação vascular (150), incluindo aumento da espessura da parede vascular, dano vascular devido ao aumento da inflamação e produção de superóxido, resultando em pronunciada vasoconstrição (151). Esses efeitos da modulação da função vascular são críticos quando se considera a importância da circulação sanguínea no transporte de células tumorais para locais secundários para conferir metástases distais; bem como a função da vasculatura tumoral no apoio ao crescimento tumoral primário e metastático *in situ*. Os efeitos na vasoconstrição são consequência da sinalização sistemática ou endócrina do SRA (152).

A Ang II atua através de dois subtipos de receptores, o AT1R e o receptor da angiotensina II tipo 2 (AT2R - *angiotensin II type 2 receptor*). O hormônio peptídico (Ang I) é convertido na forma bioativa, para Ang II (ligante do AT1R) pela ECA nas células endoteliais.

O direcionamento farmacológico do AT1R e ECA tem sido extremamente eficaz no tratamento da hipertensão e doenças renais e cardíacas crônicas, principalmente pelos potentes efeitos dos inibidores na vasodilatação, seja bloqueando a sinalização da Ang II ou sua conversão a partir da Ang I. Embora a expressão e a função dos componentes do SRA sejam bem caracterizadas em células endoteliais, a expressão em outros tipos de células pode ser sugestiva de funções adicionais. A expressão e os efeitos funcionais dos componentes do SRA, incluindo ECA, Ang I/II e AT1R, são importantes nas células endoteliais que formam a vasculatura dentro do tecido, nas células do músculo liso, células imunes incluindo monócitos, linfócitos T, macrófagos (153-156), fibroblastos e adipócitos (157-161). Além disso, a ECA solúvel é detectável no sangue e sugere que a conversão ativa de Ang I em Ang II pode ocorrer sistemicamente ou localmente (162). Em termos de produção local de Ang II e responsividade tecidual, o AT1R e ECA são expressos na maioria dos órgãos com altos níveis detectáveis no sistema nervoso central, tireoide, glândulas adrenais, pulmão, fígado, trato gastrointestinal, rim, cólon, bexiga, endométrio e trompas de falópio. A relevância do SRA no câncer é, portanto, implicada pela alta expressão de seus componentes de sinalização, particularmente AT1R e ECA, já que altas expressões foram observadas em cânceres de ovário, colo do útero, próstata, pâncreas, mama e colorretal (156, 163).

A expressão elevada e desorganizada dos mediadores de sinalização do SRA pode evocar múltiplas cascatas de sinalização para apoiar a angiogênese tumoral, remodelação vascular, proliferação celular, diferenciação, inflamação e fibrose (24). Além disso, há extensa evidência funcional demonstrando que os BRAs e IECAs têm efeitos benéficos na redução do crescimento e progressão tumoral, vascularização tumoral e metástase (34, 36, 47, 164-168).

2.3 PAPEL FISIOLÓGICO DA ECA

A ECA hidrolisa a ligação peptídica Fen⁸-His⁹ (fenilalanina 8 – histidina 9) da Ang I, que é um decapeptídeo para liberar um octapeptídeo Ang II e um dipeptídeo C-terminal His-Leu (histidina-leucina) na presença de íons de zinco. Ang II atua como um potente vasoconstritor. Provoca ações como contração da musculatura lisa vascular e retenção de água e sódio, estimulando a secreção de aldosterona, aumentando assim o volume sanguíneo após a ligação com seu receptor tipo 1. Isso leva a um aumento da pressão arterial e a um efeito inotrópico e cronotrópico positivo no coração. Um nome alternativo para ECA é cininase II,

devido à sua capacidade de clivar rapidamente cininas, e assim inativar o hormônio vasodilatador bradicinina (169). Juntamente com seu duplo papel na manutenção da pressão arterial e homeostase eletrolítica, a ECA também hidrolisa uma ampla gama de peptídeos vasoativos, como a substância P, encefalina e neurotensina. A ECA também foi identificada como o fator de liberação de proteína ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI - *Glycosylphosphatidylinositol*), liberando proteínas ancoradas por GPI da membrana do esperma (170).

2.3.1 Enzima conversora da angiotensina

A ECA foi isolada como uma 'enzima conversora da hipertensina' em 1956. Duas formas da enzima são observadas em humanos, uma forma somática, encontrada em vários tecidos, e uma isoenzima menor, a forma germinativa, encontrado exclusivamente nos testículos. Ambas as formas existem como ectoenzimas na superfície celular, hidrolisando peptídeos circulantes. Uma forma solúvel de ECA, derivada da ação de uma secretase na forma de membrana, também está presente nos fluidos corporais. Recentemente, ECA2 (enzima conversora da angiotensina II), um homólogo de ECA, foi identificado em humanos. A ECA remove o dipeptídeo carboxi-terminal do substrato e, assim, hidrolisa a Ang I e a bradicinina agindo como uma peptidil dipeptidase ou como uma endopeptidase em substratos como a colecistocinina. A ECA2, por outro lado, existe como uma carboxipeptidase que remove aminoácidos hidrofóbicos ou básicos do carboxi terminal. A ECA, portanto, pode estar comportando um papel mais diversificado no metabolismo de peptídeos presentes na superfície celular (171).

A ECA é uma dipeptidase dependente de cloreto e zinco. A isoforma predominante, expressa no pulmão é uma glicoproteína ligada à membrana. A ECA desempenha um papel significativo no equilíbrio de fluidos e eletrólitos, regulação da pressão arterial, desenvolvimento do sistema cardiovascular e remodelação vascular, hidrolisando Ang I em Ang II, um potente peptídeo vasopressor e desativando a bradicinina, o peptídeo vaso depressor como parte do SRA e sistema caliceína-cinina (KKS - *kinin-kallikrein system*) (170). Alguns autores deduziram que as características estruturais, moleculares e bioquímicas da ECA são conservadas em todos os organismos. Sugere-se, portanto, que a ECA apareceu muito antes, durante o curso da evolução, e as características da ECA em mamíferos podem ser resultado de processos

evolutivos em uma protease antiga, cujas funções na íntegra ainda precisam ser decifradas (172).

A ECA humana foi purificada por técnicas cromatográficas e eletroforéticas. É uma glicoproteína ácida composta por uma única cadeia polipeptídica de peso molecular na faixa de cerca de 140 quilodalton (kDa) e um ponto isoelétrico de 4,6. A atividade da enzima depende da presença de íons cloreto, enquanto é inibida por agentes quelantes como metais pesados, compostos sulfidríla e certos peptídeos (173). A ECA testicular é composta por 711 aminoácidos com sua massa molecular está prevista para ser em torno de 80 kDa. Tem sido sugerido que o gene ECA pode resultar da duplicação do gene devido à homologia interna presente no DNA complementar (cDNA) endotelial da ECA. Esta observação foi estendida para a estrutura gênica de domínios onde grandes homologias foram observadas entre os éxons 4 a 11 que codificam o domínio N-terminal da proteína ECA e os éxons 17 a 24 que codificam o domínio C-terminal (174).

2.3.2 Fatores que influenciam os níveis de ECA

Os níveis séricos de ECA são relativamente estáveis no indivíduo saudável em medições repetidas, mas existe uma grande variabilidade interindividual, variando até seis vezes. Diferenças na atividade sérica da ECA foram relatadas de acordo com (175):

Idade

- Recém-nascidos e prematuros têm níveis mais altos de ECA provavelmente devido ao desenvolvimento de capilares pulmonares após o nascimento. Acredita-se que a principal fonte de ECA circulante sejam as células endoteliais capilares. Como há uma hiperatividade das células endoteliais vasculares, principalmente nos macrófagos durante o crescimento e a angiogênese, as crianças apresentam maior atividade da ECA do que os adultos.

Gênero

- Diferenças relacionadas ao gênero são observadas em adolescentes, com maior atividade sérica em meninos do que em meninas. A regulação hormonal esteróide da biossíntese da ECA pode ser considerada responsável tanto pelo sexo quanto pelas variações

relacionadas à idade observadas. Em adultos, no entanto, embora nenhuma diferença nos níveis de ECA tenha sido observada devido à variação na idade, alguns estudos relataram uma menor atividade da ECA em mulheres em comparação aos homens.

Etnia

- Não há evidências concretas sobre o efeito da etnia na atividade da ECA, embora se acredite que possa existir um efeito indireto.

Polimorfismos genéticos

- Os polimorfismos genéticos também influenciam os níveis de ECA. Uma variante de inserção/deleção (I/D) de 250 pares de bases (pb) no íntron 16 no cromossomo 17q23 mostrou ser responsável por 47% da variação observada nos níveis de ECA (175).

Foi observado que a atividade sérica da ECA em indivíduos saudáveis com homocigotos DD é aproximadamente duas vezes maior do que em homocigotos II, com taxas intermediárias observadas em heterocigotos ID (176). Foi revelado em um estudo mais aprofundado que a mesma mutação pontual no nucleotídeo na posição 3705 do gene ECA que resultou em uma troca de aminoácidos (Pro1991eu) foi responsável pela secreção aumentada de ECA devido a uma clivagem mais efetiva das membranas das células endoteliais. O polimorfismo de variação I/D como marcador genético agora está sendo utilizado para estabelecer associações entre a variação do gene da ECA e uma gama diversificada de condições de saúde devido à sua facilidade de visualização (177).

2.4 SRA VIA ANG II-AT1R NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

A conversão de Ang I em Ang II é catalisada pela metalopeptidase de zinco, ou seja, a ECA (178). Os padrões de expressão da ECA indicam processamento sistêmico da Ang II bioativa, bem como localmente em diferentes órgãos e vasculatura. A produção local de Ang II também ocorre no tecido mamário normal, juntamente com a expressão de ECA, Ang I e AT1R no epitélio glandular, fibroblastos estromais adiposos e células endoteliais do tecido mamário (179).

Dada a expressão local do SRA em muitos tecidos, talvez não seja surpreendente que muitos componentes do SRA também sejam expressos em tecidos malignos. No entanto, o

SRA, em particular o AT1R, é frequentemente regulado durante a progressão de fenótipos normais para malignos, indicando pelo menos uma correlação entre o SRA e a progressão do tumor (27). Uma vez que, intrinsecamente aos tumores de vários tipos de cânceres, são encontrados a expressão local de componentes do SRA influenciando o desenvolvimento da carcinogênese e a progressão para doença metastática. Pois foi observada a expressão elevada destes componentes, principalmente a ECA, Ang II e ativação proeminente do AT1R. São exemplos da elevação destes elementos no endotélio de micro vasos e células-tronco cancerígenas em glioblastoma (180). Essas elevadas expressões também foram encontradas em modelos de câncer de mama, nas células epiteliais (157); e dentro de lesões neoplásicas e associado ao adenocarcinoma ductal em comparação com o adenocarcinoma lobular (181). Em experimentos com câncer colorretal metastático, a expressão da ECA é significativamente aumentada no fígado onde ocorre a colonização metastática, sugerindo que as lesões metastáticas contribuem para a supra regulação local da ECA (27, 166, 182, 183). Além disso, a literatura científica revela a expressão frequente da ECA, Ang II e AT1R em câncer de cérebro, pulmão, pâncreas, mama, próstata, cólon, pele e carcinomas cervicais em comparação com seus tecidos não malignos correspondentes (28). Em particular, a superexpressão do AT1R é comum. No entanto as alterações na expressão dos componentes do SRA parecem correlacionar-se com o grau do tumor (184, 185). Essas alterações, todavia, variam para cada tipo de câncer diante do grau de ativação do AT1R (186).

Como sugerido acima, sugere-se que o SRA esteja envolvido em muitos tipos de câncer, isso pode ser devido ao fato de que o SRA é composto por vários receptores, entre eles, AT1R e AT2R, receptor de pró-renina (PRR) e receptores acoplado à proteína G (*MasRs* - *G Protein-Coupled Receptors*) e diferentes tipos de efetores como Ang II, angiotensina 1-9 (Ang-(1-9)), angiotensina 1-7 (Ang-(1-7)). Em relação ao desenvolvimento do câncer, esses efetores e receptores têm ações opostas com vários aspectos (Figura 18) . Os dados clássicos concentram-se no processamento do angiotensinogênio no peptídeo ativo Ang II, e nas interações da Ang II com seus receptores principalmente AT1R (187). No entanto, o homólogo da ECA, conhecido como ECA2, foi descoberto mais recentemente e funciona para clivar o aminoácido carboxi-terminal da Ang II e gerar Ang-(1-7). A Ang 1-7 interage com seu receptor acoplado à proteína G (*MasR* - *G Protein-Coupled Receptor*) para antagonizar as ações da Ang II (156). Um mecanismo importante pelo qual o SRA exerce seu efeito pró-tumoral pode ser através da modulação da angiogênese tumoral, que é crítica para o crescimento câncer (188). A Ang II estimula a expressão de vários agentes pró-angiogênicos e fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial*

growth factor) (189, 190), angiopoietina 2 (191), fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF - *basic fibroblast growth factor*) (192) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - *platelet-derived growth factor*) (193).

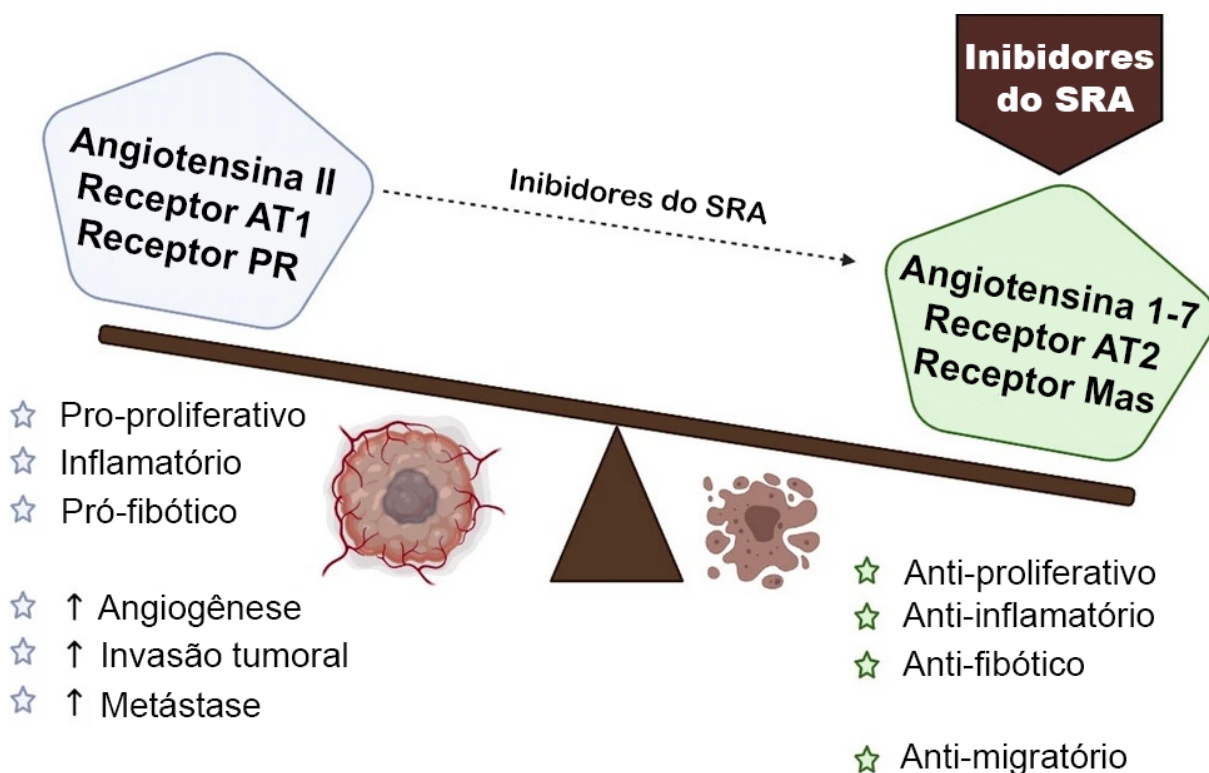


Figura 18. As Ações Contraditórias dos Receptores e Efetores do Sistema Renina-Angiotensina no Desenvolvimento Tumoral. O Sistema Renina-Angiotensina possui diferentes receptores e efetores. Os dados clássicos concentram-se no processamento do angiotensinogênio no peptídeo ativo Ang II e nas interações da Ang II com seus receptores principalmente AT1R. A ligação da Ang II ao AT1R aumenta a inflamação, a angiogênese da fibrose, a invasão tumoral e a metástase. O receptor de pró-renina (PRR - pro-renin receptor) também tem ação semelhante com Ang II. Por outro lado, quando a Ang II se liga ao AT2R, os efeitos são opostos à ligação ao AT1R. A Ang 1-7 quando se liga ao seu receptor Mas, causa função anti-inflamatória, anti-fibrótica, anti-proliferativa e anti-migratória. Os inibidores de SRA são benéficos no combate contra o câncer devido ao aumento da sinalização Mas mediada por AT2R e Ang 1-7. Fonte: PubMed “Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics” (Adaptado).

A sinalização de AT1R parece ser o principal componente do SRA que está envolvido no crescimento tumoral, induzindo angiogênese e proliferação tumoral, promovendo a expressão de VEGF ou do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - *epidermal growth factor receptor*) (27, 28, 194, 195). A angiotensina II também pode promover o crescimento e proliferação celular através do fator de crescimento transformador beta (196),

tirosina quinase (197) e ativação das vias de alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR - *mammalian target of rapamycin*) (198) (Figura 19). O bloqueio do SRA via inativação da Ang II-AT1R está frequentemente associado à redução da expressão do potente fator angiogênico, o VEGF (167, 199, 200). Os efeitos pró-angiogênicos da Ang II indicam ser mediados pelo AT1R. Em modelos de angiogênese induzida por isquemia, a Ang II promove a revascularização de vasos lesados pelo aumento dos níveis de VEGF e óxido nítrico sintase endotelial via ativação do AT1R (201). Esses efeitos angiogênicos do SRA também são evidentes em vários modelos de malignidade. As células de câncer de ovário positivas para AT1R secretam VEGF em resposta à estimulação de Ang II (168). Indicativo do potencial angiogênico da Ang II, e a notável redução da densidade microvascular do tumor tem sido um efeito comum dos IECA (166).

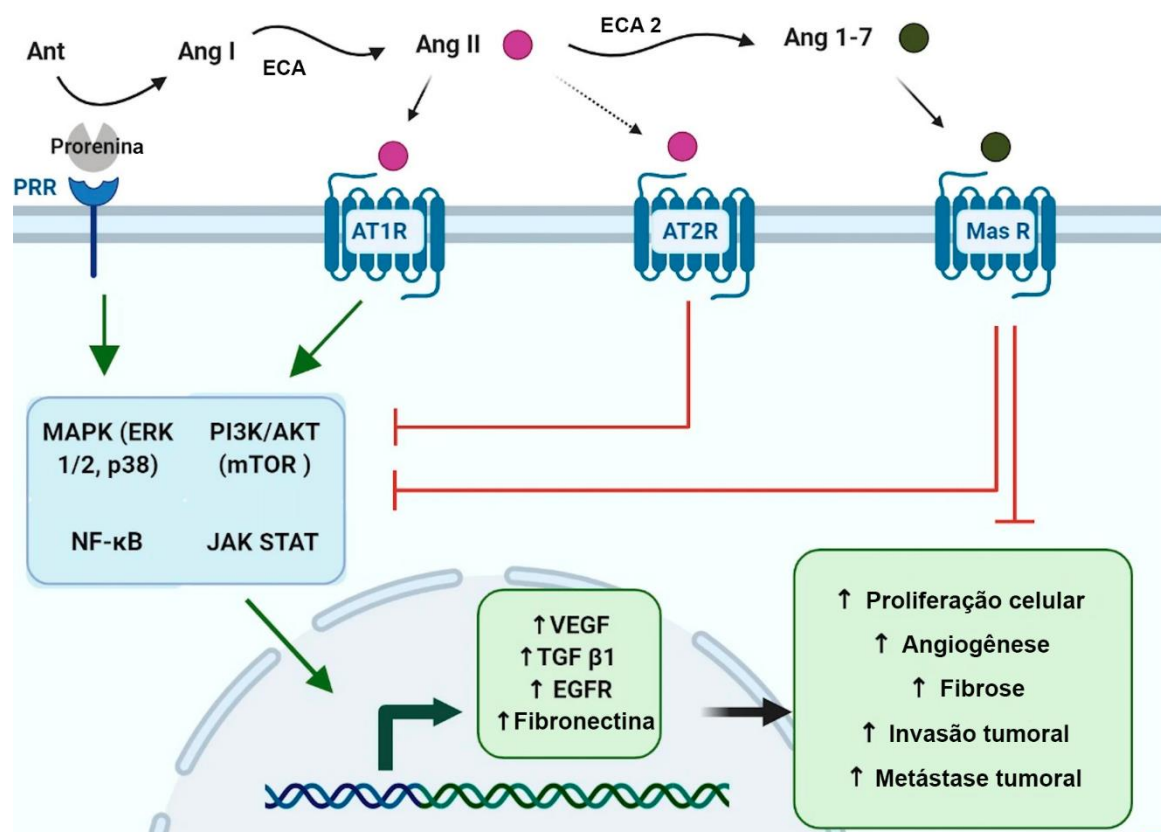


Figura 19. Vias de sinalização do receptor SRA relacionadas com a biologia do câncer. Diferentes receptores SRA ativam ou inativam várias vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento do câncer. A sinalização do receptor de AT1R e PRR ativa as vias MAPK, PI3K/AKT/mTOR, NF-κB e JAK/STAT e aumenta em VEGF, TGFβ1, EGFR e fibronectina, o que acaba levando ao aumento da proliferação celular, angiogênese, fibrose, invasão tumoral e metástase. Essas vias são inibidas pela sinalização Mas mediada por AT2R e Ang 1-7. Fonte: PubMed “Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics” (Adaptado).

O SRA também pode afetar a sobrevivência e/ou proliferação celular e pode, portanto, ter um efeito direto sobre o número de células cancerosas vivas dentro dos tumores. A Ang II pode estimular ou inibir a proliferação dependendo se o AT1R ou AT2R está ativado. Também está se tornando evidente que a Ang-(1-7) também tem um papel na definição do potencial proliferativo de algumas células. A Ang II é um mitógeno para células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais (202), e aumenta a expressão de oncogenes relacionados ao crescimento (203-205) e fatores de crescimento (28) em vários tipos de células. No entanto, a estimulação de Ang II e do AT1R pode aumentar a senescência de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea (206), que são importantes para a angiogênese tumoral (207). Esses resultados sugerem que o efeito da Ang II na proliferação pode diferir para diferentes tipos celulares, possivelmente devido às vias fisiológicas alternativas que podem ser iniciadas pelo SRA. Embora o AT2R seja comumente considerado mediador dos efeitos antiproliferativos da Ang II (208). Posto isto, o AT2R evidencia antagonizar as ações AT1R. Em um estudo utilizando camundongos deficientes em AT2R, confirmaram aumentos de VEGF e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS - *endothelial nitric oxide synthase*) induzidos via Ang II e ativação do AT1R (201), uma vez que ambas as respostas foram observadas em camundongos com genes deletados para AT2R. Este estudo também ilustrou que o AT2R pode modular negativamente a angiogênese induzida por isquemia, aumentando os processos apoptóticos. O AT2R também demonstrou inibir os sinais VEGF2/Flk-1 (Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2 / Receptor de Domínio de Inserção de Quinase) o que por sua vez resulta na redução da migração de células endoteliais e a formação de tubos (209). Contraposição com a Ang II, o peptídeo Ang-(1-7) parece inibir a angiogênese. Ang-(1-7) inibiu tanto a angiogênese quanto a proliferação de tecido fibrovascular em um modelo de esponja murina de angiogênese (210, 211). Surpreendentemente a ativação do AT2R em mediar eventos de transdução de sinal, não depende exclusivamente da Ang II, sugerindo que ativação do AT2R seguidamente de suas ações pode estar envolvidas em outras vias (212).

2.5 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

Após a caracterização das diversas funções da ECA, ficou claro que seus inibidores provocariam a inibição das ações por ela produzidas, as quais ela poderia estar realizando via

Ang I ou bradicinina. A ECA tem sido utilizada há muito tempo como alvo para testes de drogas anti-hipertensivas. A estrutura da ECA é semelhante à da carboxipeptidase A, que é conhecida por ter ácido L-benzilsuccínico atuando como seu inibidor. Portanto, com base nisso, os aminoácidos succinil foram um dos primeiros compostos alvo inibidores de ECA a serem projetados. O veneno de cobra atua como um peptídeo inibidor natural da ECA, com base no qual a succinil prolina foi sintetizada (170).

A ECA visto que representa uma dipeptidil carboxil metalopeptidase bivalente, no que lhe diz respeito é uma enzima de membrana nas células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais e no cérebro, além de estarem presente na forma solúvel no sangue e em numerosos fluidos corporais. A ECA cliva o dipeptídeo C-terminal da Ang I e da bradicinina, interagindo assim com o SRA e o sistema calicreína-cinina simultaneamente (213). Entende-se que a ECA tem um papel fundamental no equilíbrio entre as propriedades vasodilatadoras e natriuréticas da bradicinina e as propriedades vasoconstritoras e retentivas de sal da Ang II. Um aumento na atividade da ECA perturba esse delicado equilíbrio e promove Ang II vasoconstritora e retentora de sal e diminui a bradicinina vasodilatadora e natriurética. Os IECA restaura esse equilíbrio diminuindo a formação de Ang II e a degradação da bradicinina (214). Em suma a atuação dos IECA no SRA implica na inibição da ECA, o qual o mesmo é responsável pela conversão da Ang I em Ang II, impedindo os efeitos mediados pelo AT1R, uma vez que a ligação da Ang II nos receptores AT1 nos músculos lisos induz a vasoconstrição das arteríolas pré-capilares e vênulas pós-capilares, inibindo recaptção de norepinefrina e a liberação de catecolaminas da medula adrenal, o que aumenta a pressão arterial. A angiotensina II também é responsável em estimular o córtex adrenal a secretar aldosterona. A aldosterona faz com que os túbulos distais e os ductos coletores dos rins reabsorvam água e sódio em troca de potássio, o que resulta em expansão do volume extracelular e aumento da pressão arterial (215).

Um grupo de IECAs estão atualmente no mercado. Esses inibidores diferem na estrutura química de suas porções ativas, bem como em sua potência, biodisponibilidade, meia-vida plasmática, via de eliminação, distribuição e afinidade pela ECA ligada ao tecido e se são administradas como pró-drogas. Os IECA desempenham uma ampla gama de funções terapêuticas. Junto com seu uso mais comum como anti-hipertensivos, eles agora são amplamente utilizados no tratamento de doenças dos sistemas endócrino, cardiovascular e urinário. Seu uso leva à redução da hipertrofia e fibrose do miocárdio e, assim, observou-se melhora no remodelamento ventricular. Notou-se que o uso de IECA leva a uma melhora na atividade do sistema nervoso autônomo em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Foi

comprovado que o uso prolongado de IECA leva a uma diminuição na secreção de proteínas urinárias associada a nefropatias, melhoram a função cardíaca e retardam a progressão da insuficiência renal, melhorando assim o padrão de vida do paciente e aumentando sua expectativa de vida (170).

Os IECAs podem ser classificados em três grupos de acordo com a estrutura química de sua porção ativa. Captopril ou D-3-mercaptopropanoil-L-prolina com sulfidril como um forte grupo quelante foi posteriormente projetado através de várias modificações como um inibidor oral não peptídico da ECA, outros são fentiapril, pivalopril, zofenopril e alacepril. O fosinopril é o único inibidor da ECA que contém um grupo fosfinil como sua porção reativa. A maioria dos outros IECAs, como lisinopril, enalapril e perindopril, contém uma porção carboxil (214). O captopril, em particular, foi o primeiro inibidor da ECA aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) por seus efeitos anti-hipertensivos (216). O captopril em 1981 foi o primeiro IECA disponível, e a partir daí tem sido amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças cardiovasculares. As ações do captopril na hipertensão e na insuficiência cardíaca agem principalmente da supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (217).

2.5.1 Efeito anticancerígeno dos IECAs

O SRA (27) e os receptores da angiotensina (28) têm demonstrado seu relevante papel no câncer, uma vez que a via ECA-Ang II-AT1R começou a ser visto como um alvo terapêutico contra a carcinogênese (218, 219). A Ang II tem um papel antiapoptótico envolvendo ativação de AT1R/fosfatidilinositol 3-quinase/Akt e a subsequente supressão da ativação de caspase-9 (220) e caspase-3 (221). Visto que a Ang II atua através do AT1R para aumentar a expressão do VEGF, resultando em proliferação, migração e angiogênese de células endoteliais (222, 223). A ativação de AT1R também é relatada para induzir citocinas e quimiocinas inflamatórias através da proteína quinase ativada por mitógeno, e vias do fator nuclear- κ B (224). Todos esses processos mediados por AT1R são importantes na indução e progressão do câncer. Assim sendo, trabalhos científicos na descoberta de mecanismos inibitórios desses agentes, tem sido extremamente necessário.

Vários estudos *in vivo* em modelos tumorais revelaram que os IECAs inibem o crescimento tumoral (225) e a angiogênese (200, 226). O efeito benéfico dos IECAs na

supressão do crescimento tumoral é mediado principalmente pela inibição dos níveis de Ang II dependente de SRA e aumento dos níveis de bradicinina (227). Outra atividade anticancerígena de alguns IECAs provavelmente se deve às suas propriedades intrínsecas de quelação de metais, que se acredita serem responsáveis pela inibição da metaloproteinase da matriz (200, 228). O efeito direto de alguns inibidores ECA é a redução do inibidor do ativador do plasminogênio e outro efeito é devido ao seu grupo sulfidril livre, que leva à geração de angiostatina, que por sua vez inibe a angiogênese (229). O grupo sulfidril presente no inibidor da ECA impede a ativação subsequente da metaloproteinase da matriz e do fator de crescimento endotelial vascular, evitando assim uma maior invasão e angiogênese (45, 226, 228, 230-234).

Um estudo prospectivo em “Glasgow Blood Pressure Clinic” com 5.027 pacientes, mostrou que os IECAs podem proteger contra o câncer, esse mesmo estudo descobriu que a incidência de cânceres fatais foi reduzida em pacientes tratados com inibidores da ECA por > 3 anos (235). Um segundo estudo de coorte com análise de caso-controle aninhada descobriu que o captopril, um IECA, estava associado a um menor risco de desenvolver câncer de próstata (236). Um risco reduzido de desenvolver câncer de esôfago (55%), pancreático (48%) e cólon (47%) foi observado em uma avaliação de 483.733 pacientes, 38% dos quais estavam tomando IECA (237), esta droga também mostrou eficácia no manejo da cardiotoxicidade pós-antraciclina em sobreviventes de câncer pediátrico, e sem aumentar o risco (238). O papel da ECA no câncer é ainda apoiado pelas descobertas de que o polimorfismo da ECA está associado a vários tipos de câncer (28, 32, 239-241).

Achados na literatura mostra aumento da atividade renal da ECA2 como resultado da supressão da síntese ou atividade de Ang II, esses mesmos resultados confirmam que a ECA2 não é sensível ao bloqueio da ECA, no entanto, os dados mostram que a inibição da ECA está associada ao aumento da atividade renal da ECA2, conseqüentemente um aumento da Ang-(1-7) e do MasR como um fator que contribui para as ações renoprotetoras da interrupção da conversão da Ang I em Ang II com inibidores da ECA (242). Curiosamente outros estudos, revelaram que o captopril foi capaz de elevar os níveis de Ang-(1-7) nos órgãos periféricos, incluindo pulmões e ossos (243-245). Como principal peptídeo bioativo do eixo alternativo do SRA, Ang-(1-7) é gerada predominantemente pela ECA2 e exerce efeitos fisiológicos via seu MasR (246). Um estudo indica que o AT2R funciona para diminuir a atividade da ECA, o que pode, em parte, estar subjacente à atenuação cada vez mais reconhecida do AT2R das ações mediadas pelo AT1R. Esse estudo sugere que as ações vasodilatadoras e antiproliferativas atribuídas ao receptor AT2 podem estar ligadas à inibição da ECA através dos IECAs (247).

Assim, vários estudos suportam as decorrências anticancerígenas dos IECAs através de mecanismos dependentes e/ou independentes do SRA, e esses inibidores podem contribuir a entender as interações entre os componentes do SRA na carcinogênese e projetar novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a inibição da enzima conversora da angiotensina como potencial alvo terapêutico no combate contra o carcinoma de células escamosas oral (CCEO).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar o efeito do inibidor da enzima conversora da angiotensina (captopril) na viabilidade de linhagem de células do CCEO humanas (SCC-9).
- 2 Avaliar o impacto do captopril na proliferação de células SCC9.
- 3 Analisar a indução da peroxidação lipídica na inferência da apoptose através da inibição da enzima conversora da angiotensina em células SCC9 tratadas com captopril.
- 4 Inferir a intervenção do inibidor da enzima conversora da angiotensina na migração de células SCC9.
- 5 Avaliar o efeito do captopril na invasibilidade de células do CCEO humanas.
- 6 Investigar a angiogênese no ambiente tumoral e seus efeitos com tratamento através do inibidor da enzima conversora da angiotensina como um antimetastático.
- 7 Categorização dos parâmetros morfológicos do epitélio da cavidade bucal em animais submetidos ao desenvolvimento da carcinogênese oral pela análise clínico patológico

e determinação das gradações histológica para posterior investigação de existência de possíveis associações entre grupos tratados e não tratados com o captopril.

4 HIPÓTESE

Tendo como base a revisão literária científica espera-se que os ensaios possam alcançar os seguintes resultados:

Ensaio *in vitro*

A inibição da enzima conversora da angiotensina através do captopril possa contribuir na atenuação da viabilidade e proliferação do carcinoma de células escamosas oral, subsequente a indução da apoptose, e diminuição da migração associada a redução da invasão das células escamosas malignas.

Ensaio *in vivo*

Animais com carcinoma de células escamosas oral tratados com um inibidor da enzima conversora da angiotensina tende-se a apresentar menor agressividade morfológica diante das observações histopatológicas além de expressar resultados promissores como potencial alvo terapêutico contra a angiogênese tumoral na indução da metástase.

5 PRODUTO

Angiotensin-converting enzyme inhibitor as a potential therapeutic target in oral cancer

Emisael Stênio Batista Gomes¹, Marcela Gonçalves de Souza¹, Rogério Gonçalves da Rocha¹, Lincoln Valério Andrade Rodrigues¹, Maria Isabela Campos Ruas¹, Osvaldo Sena Guimarães², Lucyana Conceição Farias^{1,3}, Alfredo Maurício de Paula Batista^{1,3}, Sérgio Henrique Sousa Santos^{1,5}, André Luiz Sena Guimaraes^{1,3,4*}

1 Health Sciences Laboratory, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

2 Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Engineering Department, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

3 Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

4 Dilson Godinho Hospital, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

5 Institute of Agricultural Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author:

André Luiz Sena Guimarães

Universidade Estadual de Montes Claros. Hospital Universitário Clemente Faria. Health Sciences Laboratory, 562 Av. Cula Mangabeira Santo Expedito. Montes Claros, Minas Gerais. Brazil Zip code: 39401-001 E-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

Funding source: This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Hospital Universitário Clemente de Faria (HU), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Oral cavity cancer (OCC) is one of the most common types of cancer for its high epidemiological rate. Oral squamous cell carcinoma (OSCC), which arises from oral mucosal surfaces, is associated with lifetime exposure to alcohol and tobacco, as well as with human papillomavirus (HPV) infections. The prognosis and therapeutic alternatives vary depending on the profile and certain individual characteristics that can trigger metabolic disorders and vary with the presentation of many symptoms, namely physical, emotional, and psychological. Surgery and radiation therapy are currently the most common treatments but implementing new therapeutic methods is crucial to control the mechanisms that cause death due to rapid growth, invisibility, and metastasis. It has already been demonstrated that the renin-angiotensin system (RAS) has a potential involvement in cancer progression, inducing angiogenesis, growth, and metastasis. This article reports experimental *in vitro* and *in vivo* studies exploring angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) as a potential therapeutic target in OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Angiotensin-converting enzyme inhibitor, Captopril.

Introduction

Cancer is a leading cause of death worldwide. A total of more than 19 million new cases and 9 million cancer-related deaths were reported in 2020. Oral cavity cancer (OCC) is one of the most common types of cancer with an epidemiological 2020 rate of 377 713 new cases, 177 757 deaths, and a prevalence of 959 248 in five-year (1). Head and neck cancers arise on the mucosal surfaces of four main anatomical sites: oral cavity, nasal cavity, pharynx, and larynx. It is in most cases associated with lifetime exposure to alcohol and tobacco and with infection by specific strains of human papillomavirus (HPV) (2). More than 90% of OCC arise from squamous tissues, hence they are known as oral squamous cell carcinoma (OSCC) (3, 4). The prognosis and therapeutic alternatives depend on epidemiological factors, anatomical location, invasiveness, and cancer stage (5). Metabolic disorders, inflammatory factors, cachexia, physical inactivity, reduced nutrient intake, dysphagia, trismus, xerostomia, mucositis, pain, and dental problems can develop depending on tumor characteristics

and grade (6-8). This symptom burden can have significant physical, emotional, and psychological consequences, thus negatively affecting the patient's quality of life (9). Surgery and radiation therapy are the most common treatments for early-stage tumors. For advanced tumors, surgery is used in combination with postoperative chemoradiotherapy or follows preoperative chemoradiotherapy as a second alternative after failure of the initial treatment (salvage surgery) (10, 11). Although scientific advances have been made in recent years regarding treatment modalities, the incidence and mortality rates for OSCC are still high for its rapid growth, invasiveness, and distant metastasis. Therefore, investigating the mechanisms that lead to the development of OSCC is crucial for finding potential therapeutic agents.

The renin-angiotensin system (RAS) is important for cardiovascular balance, since it regulates several physiological functions by establishing a cascade of components first synthesized by the juxtaglomerular cells of the renal afferent arterioles (12). In the RAS, the enzyme renin cleaves the peptide angiotensinogen converting it to the decapeptide angiotensin (Ang) I that is then converted to Ang II by the angiotensin-converting enzyme (ACE). Ang II activates the angiotensin type 1 receptor (AT1R) that then causes vascular constriction, water intake, and Na⁺ retention. The RAS has a role in some pathological conditions, such as inflammation, fibrosis, hypertrophy, and oxidative stress (13). Other studies also show that the components of the RAS are involved in cancer progression (14-19), since AT1R activation by Ang II can affect apoptosis, migration, and proliferation (20-23), as well as induce tissue angiogenesis through upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) (24, 25). Based on this, it has become increasingly acknowledged in recent years that the RAS is involved in angiogenesis, progression, and metastasis in various types of cancer (21, 26).

Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) are drugs commonly used as antihypertensive agents, mediating their effects by inhibiting ACE, preventing the conversion of Ang I to Ang II a key peptide of the RAS, and thus preventing the activation of AT1R. Evidence shows that ACEI play a key role in carcinogenesis prevention, cancer regression, and prolongation of survival, acting as an anti-metastatic factor in different cancer types, including colorectal, breast, pancreatic, skin, prostate, lung, renal, and hepatocellular carcinoma (26-41). This study investigated an ACEI and its therapeutic effects in OSCC.

Material and methods

In vitro experimental design

Cells

The human OSCC cell line, SCC9, from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) was used for the in vitro experiments. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, South America), antibiotics, and 0.4 µg/mL of hydrocortisone (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Drug

Captopril was used as an ACEI in all experimental assays to assess its potential as a therapeutic alternative for OSCC.

Cell viability assay

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to determine the viability of SCC9 cells treated with captopril at concentrations of 0, 6.25 mM, and 12.5 mM in the presence of medium (DMEM-F12/incomplete) containing 0.125 and 0.250% of dimethylsulfoxide (DMSO) as vehicle respectively the drug dosages. Two different concentrations of the vehicle were required since different concentrations of the drug required the corresponding dilution of the solute (captopril). A preliminary test (**Supplementary material 1**) was performed to assess the toxicity of DMSO in SCC9 cells and select DMSO concentrations that were safe for its use as a vehicle without causing cellular damage. For this, 3 x 10³ cells were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h. SCC9 cells were then treated for periods of 24 and 48 h (**Supplementary material 1**). All procedures were performed at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂. A volume of 10 µL (0.5mg/mL) of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; M6494, Molecular Probes Life Technologies) was added to the cells and then incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. Next, 100 µL

of DMSO was used to dissolve the resulting formazan crystals. The absorbance was determined using a microplate reader (Diatek Instruments, DR-200B) at a wavelength of 540 nm. This experiment was carried out in sextuplicate.

Cell proliferation assay

To assess the proliferative potential of SCC9 cells, a cell proliferation assay was performed as previously described (42). Cells were plated at a density of 1×10^5 and grown in 12-well culture plates in medium (DMEM-F12) with FBS for 24 h for cell stability. Next, the wells were washed three times with 1X phosphate-buffered saline (PBS), and of a new medium without FBS was added, and cells were incubated for another 24 h. On the following day, the medium was discarded, the wells were washed again with 1X PBS, and then treated with captopril at concentrations of 0, 6.25 mM, and 12.5 mM in medium (DMEM-F12) without FBS for 24 h. Next, cells were trypsinized, and cell viability was assessed by trypan blue staining (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were counted in a Neubauer chamber (Prolab, São Paulo, SP, Brazil) using an IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, USA). This assay was performed in quadruplicate.

Reactive oxygen species (ROS) assay

SCC9 cells were plated and grown at a density of 5×10^4 in 12-well plates. After 24 h, cells were treated with captopril at concentrations of 0, 6.25, and 12.5 mM. After 24 h of treatment, cells were washed with 1X PBS and incubated with 10 μ M of 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 30 min at 37 °C, and then washed again three times with 1X PBS as previously described (43). Next, images were captured and recorded using an FSx100 inverted fluorescent microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, CA), and quantified using ImageJ software. Wells treated with 100 μ M H₂O₂ in 2% FBS were used as an internal positive control for the formation of reactive oxygen species (ROS). This assay was performed in quadruplicate.

Cell death assay with acridine orange / ethidium bromide (AO/EB)

Cell death was quantified using the AO/EB staining method. This assay examines viability and membrane integrity by fluorescence. AO (Excitation 460-495, Emission 510-550, DM505 filter) penetrates the cells and their nuclei turn green, while EB (Excitation 360-370, Emission 420-460, DM400 filter) stains cells that have lost cytoplasmic membrane integrity and their nuclei stain red. Early apoptotic cells show a greenish-yellow staining due to early chromatin fragmentation, whereas late apoptotic cells show a condensed and fragmented reddish-orange chromatin (44, 45). SCC9 cells were plated at a density of 3.5×10^5 in 6-well plates and cultured for 24 h. Next, cells were washed with 1X PBS, treated with different concentrations of captopril (0, 6.25 mM, and 12.5mM) in FBS-free medium (DMEM-F12), and incubated for 24 h. Cells were then trypsinized, transferred to a microtube, centrifuged, and supernatants (treatment medium) were discarded. Each pellet (cells) was resuspended in 25 μ L of the dye at a concentration of 100 μ g/mL of AO and 100 μ g/mL of EB (double fluorescent staining solution) and incubated for 5 min at 37 °C and 5% of CO₂ protected from light. Next, 25 μ L of each cell suspension was transferred to a glass slide and covered with a coverslip for observation and recording of images using an FSx100 inverted microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, CA) for further analysis and cell quantification with ImageJ software (43). Each assay was performed in quadruplicate.

Wound healing assay

Cell migration ability was measured using a wound healing assay as previously described (46, 47) with some adaptations. Briefly, SCC9 cells were plated at a density of 1.5×10^5 per well in 12-well plates in FBS-free medium (DMEM-F12) and incubated overnight to form a confluent monolayer. A wound was then made by scraping the cell monolayer with a sterile 200 μ L plastic tip. Next, wells were washed three times with 1X PBS to remove cell residues, and FBS-free medium with the different concentrations of captopril (0, 6.25 mM, and 12.5 mM) was added. Images of the wells were taken at the beginning of the experiment and after 24 h using an IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, USA). The assays were performed in

quadruplicate and wound healing rates were quantified and analyzed with ImageJ software.

Transwell cell invasion assay

The cell invasion assay of SCC9 cells were employed using prepared 24-well plate and associated with a transwell chambers equipped with polycarbonate filters (pore size 8 μm ; Corning Inc, NY, USA) as previously described (46, 48) with some improvements. Briefly, chambers were coated with 50 μL of FBS-free DMEM-F12 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with Matrigel in a ratio of 1:3, respectively. This mixture solidified overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humid atmosphere of 5% CO_2 . On the following day, 200 μL of FBS-free DMEM-F12 with 2.5×10^5 SCC9 cells were added to the upper chambers of the Matrigel pre-coated membranes, with the corresponding treatments of 0, 6.25 mM, and 12.5 mM of captopril. The lower chambers were filled with medium containing 10% FBS. After incubation for 24 h, the non-invasive cells and the Matrigel layer were mechanically removed using cotton swabs, and the microporous membrane at the bottom was fixed with 4% paraformaldehyde and stained with hematoxylin. The number of invasive neoplastic cells was observed and imaged with an FSx100 inverted microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, CA) for further analysis and cell quantification with ImageJ software. Each assay was performed in quadruplicate.

In vivo experimental design

Ethical approval

The animal studies were conducted as advised and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation and Welfare (CEEBEA) of the State University of Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, through process number 140/2017.

Chorioallantoic membrane (CAM) assay

Preparation of treated groups for cell inoculation in the CAM

SCC9 cells were thawed and placed in culture flasks in complete medium (DMEM-F12 + 10% FBS) until 80 to 85% confluency. The flasks were then washed three times with 1X PBS. Then, incomplete DMEM-F12 medium + captopril (6.25 mM and 12.5 mM) diluted in DMSO (0.250%) were added. As for the vehicle group, only incomplete medium with DMSO (0.250%) was added to the cells. After 24 h, the treated cells were trypsinized, transferred to a Falcon tube, centrifuged, counted, resuspended in incomplete medium + Matrigel (1:1), and then inoculated in the chick chorioallantoic membrane.

Cell inoculation in the CAM

Fertilized chicken eggs (purchased from a farm in the region) were washed with neutral soap and sterilized with 70% alcohol for subsequent exposure to ultraviolet (UV) radiation for 15 min. Next, eggs were incubated for 72 h at 37.5 °C with 60-80% humidity. The chorioallantoic membrane (CAM) assay was performed as previously described above (49) with some modifications. On day 3 of embryo growth, 6 to 10 mL of albumin were removed through a hole in the shell in the narrowest part of the eggs using a 20 mL syringe attached to an 18 x 20 mm veterinary needle, with subsequent sealing using sterile adhesive tape. A circular opening was then done on the opposite side of that first hole, so in the wider region of the egg, using a DREMEL 3000 micro grinder to then introduce an aliquot of 60 µL containing 4×10^6 SCC9 cells in incomplete medium (DMEM-F12) + Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in a ratio of 1:1, as described in the previous step. The aliquots were placed inside sterilized acrylic rings to prevent leakage. Seven days after cell inoculation, the embryos were photographed, and angiogenesis was quantified in a specific circular region established around the tumor that was twice as large as the acrylic ring containing the SCC9 cells. The vessels were measured using ImageJ software. This assay was performed with an n of six embryos for each group. The groups control and vehicle (0.250% DMSO) were absent from drug exposure as treatment, while the other groups were treated with captopril at the following concentrations 6.25 and 12.5 mM.

Experiments in mice

Groups

Six-week-old Swiss male mice were purchased from the State University of Montes Claros (UNIMONTES). The animals were randomly divided into four groups of ten animals each, and exposed to the following conditions: control group (no intervention), captopril group with administration of an ACEI (captopril 10 mg/kg/d) by gavage for 11 weeks as previously described (50) with some modifications, 4NQO group (4-nitroquinoline-1-oxide) with exposure to a carcinogen, and 4NQO + captopril group as shown in **Figure 1**.

Oral cancer induction in an animal model

This assay was selected based on previous studies (51) with some improvements. Those studies observed that this assay limits the non-neoplastic toxic effects of 4NQO and leads to a greatly attenuated incidence of esophageal neoplasms, but a 100% incidence of oral cancer. The groups of animals exposed to the carcinogen received 4NQO (N8141-5 G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in the drinking water at a final concentration of 50 µg/mL for 16 weeks. The mice were followed for another 13 weeks in the absence of the carcinogen until completing a total experimental period of 29 weeks (**Figure 1**). Next, the animals were euthanized following the guidelines of the animal ethics committee. For the duration of the experiment, the mice had free access to food and drinking water. The animals were housed on a 12-hour light-dark cycle and the temperature was kept at 23.0 ± 2.0 °C.

Histology

Histology was performed following a previously described procedure (52). Briefly, the biological materials were embedded in paraffin. These blocks were then serially sectioned at a thickness of 3 µm with a microtome (Easy Path EP-MR10). The sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin. Samples in glass slides were covered with coverslips and sealed for observation and quantification using an FSx100 inverted microscope (Olympus, Center Valley, Palo Alto, CA). Later

analysis by a pathologist was blinded regarding the groups. The pathologist classified the mouse lesions into absent dysplasia, mild/moderate dysplasia, and severe dysplasia/carcinoma.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Advanced Statistics for Windows (Version 20.0, SPSS, Inc, Chicago, IL) and GraphPad Prism (Version 6.1, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For the normality test, the Kolmogorov-Smirnov test was adopted to verify the normal distribution of the samples. Samples with a normal distribution were analyzed by the One-Way ANOVA test with Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Samples that did not show a normal distribution were analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test to assess differences between 2 groups. For histology, clinicopathological factors were analyzed using the chi-square test (χ^2). The 50% inhibitory concentration (IC50) values were calculated based on percent inhibition dose-response curves using GraphPad Prism. Probability values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of ACEI on cell viability and proliferation in human oral cancer cells

The MTT assay was performed to investigate the effect of ACEI on cell viability in the human SCC9 cell line (**Figure 2-A**). The results revealed that the groups; control and vehicles (0.125 and 0.250% DMSO) showed no significant effects between them, but a significant difference was observed for groups treated with captopril at concentrations of 6.25 mM and 12.5 mM ($p=0.002$ and $p<0.001$, respectively) compared to the control group, in a 24 hours time interval. Results were similar to those of the cell proliferation assay. When compared to the control group, there was a significant reduction in cell propagation in SCC9 cells treated with 6.25 mM and 12.5 mM concentrations of captopril ($p=0.001$ and $p<0.001$, respectively) as shown in **Figure 2-B**. The experimental results demonstrated a reduction in cell viability in the MTT assay, and an antiproliferative effect in the cell proliferation assay in ACEI-treated SCC9 cells.

Reactive oxygen species (ROS) assay

ROS are produced by normal physiological processes and play important roles in cell signaling and tissue homeostasis (53, 54). Intracellular ROS induce lipid peroxidation, which has a relevant role in cell death. ROS not only activate apoptotic signaling pathways but also induce autophagy and cellular ferroptosis. This essential mechanism is based on the excess of ROS that attack the biomembranes, promoting chain reactions of lipid peroxidation, and subsequently, inducing different types of cell death (55). ROS levels in SCC9 cells were analyzed using a fluorescent assay and presented as the proportion of green fluorescence-labeled cells (ROS-positive cells) in each merged field. As shown in **Figure 2-C**, the proportion of ROS-positive cells increased following treatment with ACEI. Intracellular ROS levels were significantly ($p < 0.001$) higher in SCC9 cells treated with captopril at concentrations of 6.25 mM and 12.5 mM when compared to untreated groups (control and vehicle).

Cell death assay with acridine orange/ethidium bromide (AO/EB)

The AO/EB staining after treatment with ACEI showed the presence of early and late apoptotic cells. Early apoptotic cells were identified by AO staining, asymmetric granules, greenish-yellow color, and/or crescent-shaped nuclear staining. Late apoptotic cells were identified based on EB nuclear staining, reddish-orange color, and asymmetrically located. Moreover, the number of early and late apoptotic cells was significantly higher in cells treated with 6.25 mM and 12.5 mM concentrations of captopril when compared to the control and vehicle groups ($p < 0.001$) (**Figure 2-D**). Therefore, the AO/EB staining clearly shows that this ACEI is a potential inducer of apoptosis in human SCC9 cells, supporting the data from the previous assay.

Cell invasion assay

Since this ACEI showed an antiproliferative and apoptosis-inducing effect in the present study, it was hypothesized that it could affect the migration and invasion of human OSCC cells. To investigate this hypothesis, wound healing and transwell invasion assays were performed using the SCC9 cell line. The migratory response of SCC9 cells was assessed following treatment with captopril for 24h at concentrations

of 0, 6.25 mM, and 12.5 mM. The migration assay revealed a statistically significant ($p < 0.001$) decrease in the migration ability of SCC9 cells at captopril concentrations of 6.25 mM and 12.5 mM when compared to the control and vehicle cells as shown in **Figure 2-E**. A demonstration video (**Supplementary material 2**) shows the 24 h migration ability of control SCC9 cell group compared to the ACEI-treated SCC9 cell groups (data not quantified). Subsequently, the ability of SCC9 cells to invade through Matrigel and membrane pores in transwell chambers was investigated using a cell invasion assay. As illustrated in **Figure 2-F**, the number of invasive SCC9 cells in the control and vehicle groups were significantly higher compared to the treated groups (captopril at 6.25 mM and 12.5 mM) ($p < 0.001$). Collectively, these results reveal that treatment with ACEI significantly reduced the migratory ability and invisibility of SCC9 cells, evidencing an anti-metastatic effect of ACEI.

CAM assay

The formation of new blood vessels from preexisting vessels (angiogenesis) is a hallmark of tissue repair, growth, remodeling, and healing both in physiological processes and in various pathologies, including cancer (56-59). Tumor angiogenesis is known as the ability of tumors to attract blood vessels or stimulate the formation of new vessels. These blood vessels provide the carcinoma with nutrition and oxygen, thereby sustaining its growth and subsequent metastasis (58, 60). Many angiogenic factors include members of the family of platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), angiopoietin (ANGPT), hepatocyte growth factor (HGF), and interleukin 8 (IL-8), with some of the most relevant groups belonging to the vascular endothelial growth factor (VEGF) family (61-63). Antiangiogenic treatments are indicated as a strategy for interrupting tumor supply by inhibiting nutrition, oxygenation, and metastasis (57, 64).

The CAM assay is an experimental model widely used to study and quantify blood vessels during angiogenesis. The CAM is a highly vascularized extraembryonic membrane with numerous functions during embryonic development, such as gas and waste exchange (65, 66). During embryonic development in chicken, the mesodermal layers of the allantois and chorion fuse to form the CAM. The CAM experiment can be used to assess tumor growth and metastasis in response to drugs based on angiogenic and anti-angiogenic analyses (67, 68). This assay was used to quantify the number of

vessels that migrated to the tumor region and the thickness of the blood vessels as shown in Figure 3-A. The results show no significant differences between the control and vehicle groups, but a significant decrease was observed in the number of migrated and ligated vessels in the tumor region in captopril-treated embryos (6.25 mM and 12.5 mM) compared to the control group ($p=0.003$ and $p=0.005$, respectively) (Figure 3-B). A quantitative analysis of vessel thickness and density revealed a significant increase ($p<0.001$) in vessel thickness in the control group compared to the treated groups (captopril at 6.25 mM and 12.5 mM) as shown in the Figure 3-C. These results show that this ACEI is a potential therapeutic target against tumor angiogenesis and metastasis since the number of vessels and their thickness are suppressed with ACEI treatment.

Histological analyses

The morphological parameters of the epithelium, such as keratinization, nuclear polymorphism, tumor-stroma interaction (invasion pattern), and lymphocytic infiltration, were used to define the histological grades with the following classifications: absent dysplasia, mild/moderate dysplasia, and severe dysplasia/carcinoma. Inter-group analysis based on clinical pathological parameters revealed an association ($p<0.001$) between histological grades and treatment with ACEI (**Figure 4**). These data showed a more pronounced histological aggressiveness (severe dysplasia/carcinoma) in the untreated group (4NQO) compared to the ACEI-treated group (4NQO + captopril), with 61.5% vs 38.5% respectively.

Discussion

RAS is commonly associated with the systemic regulation of cardiovascular homeostasis. However, studies reveal that local expression of several components of RAS in cancer cell lines and tissues (14-19, 69-71) the RAS can affect survival, viability, proliferation, apoptosis, and inflammation (21), thereby indicating that it has a direct effect on the number of cancer cells in the tumor. Ang II is a mitogen for fibroblasts, smooth muscle cells, and endothelial cells (72) and also increases growth-related oncogenesis, as AT1R activation by Ang II induces cell proliferation in several cell lines, including human cancer cells (22, 73-75), moreover, activation of several

intracellular cascades of protein kinases is generally associated with stimulation of epidermal growth factor (EGF) (76).

Oral carcinogenesis is a complex pathological process involving several genetic and epigenetic alterations (77, 78) that transforms biologically healthy cells into mutated cells, thus leading to increased rates of cell proliferation, invasiveness, and metastasis (79). Experimental studies on malignant epithelial neoplasia found high levels of ACE in the oral mucosa, skin, and larynx (80-82). Furthermore, a polymorphism and its association to elevated levels of ACE and progression of oral carcinogenesis have been reported (83). The initial experiment of the present work showed that ACEI attenuated cell viability and proliferation in an OSCC cell line (SCC9), thus indicating that deactivation of AT1R by ACE inhibition decreases cell viability and cell proliferation in OSCC. Compounds such as ACEI that block Ang II production and posterior inactivating AT1R have been shown to have satisfactory effects in several aspects, including progression, viability, and proliferation ability in OSCC, as shown in our results (**Figure 2-A and B**).

One of the important routes by which RAS has its pro-tumor effects is through the modulation of angiogenesis, which is a crucial factor for the development of head and neck squamous cell carcinoma (84). Studies in humans have shown genotypic changes and increased activation of components of RAS and the consequent evolution of migration, invasive, and metastatic abilities (85). However, the ACEI used in the present study was shown to attenuate the migration and invasive abilities of OSCC cells (**Figure 2-E and F**).

A correlation between oxidative stress and OSCC has been previously reported as ROS were reduced in patients with advanced oral cancer, but high levels of ROS induce OSCC cell death (86). Therefore, ROS is another important therapeutic target in anticancer strategies in OSCC. Many studies showed ROS-mediated induction of apoptosis, including in OSCC, in this case, erufosine was used to induce ROS in OSCC cell lines and the loss of mitochondrial membrane potential was observed (87). Other studies investigated the compound β -lapachone since it induces ROS-mediated apoptosis in OSCC cells (88). Further studies have shown that some compounds (sinularin and sinuleptolide) from soft coral also mediate ROS-induced apoptosis, causing DNA damage in OSCC cells in vitro (89, 90). Intracellular ROS are closely related to cell death and play an important role in both apoptosis and ferroptosis (55), with the latter characterized by mitochondrial shrinkage and intracellular iron

accumulation by inducing lipid peroxidation through ROS (91, 92). Our experiments show induction of apoptosis in SCC9 cell lines, with ROS as an intermediate in the ACEI-induced apoptosis in OSCC cells.

Invasive carcinomas show high expression of VEGF (93-96), resulting in significantly higher densities of intratumoral microvessels in cases of strong AT1R activation via Ang II (97-99) since Ang II regulates circulating blood volume and stimulates neovascularization, cell proliferation (100-102), and VEGF secretion (24, 84, 100, 103, 104). Antiangiogenic interventions have been shown to be among the most promising against cancer. Treatments inhibiting the development of the tumor vasculature can lead to rapid tumor regression, as experimental studies show a significant increase in apoptosis in tumor cells after therapy with antiangiogenic agents (105, 106). Furthermore, studies report a significant decrease in tumor growth and angiogenesis by ACEI-induced suppression of VEGF levels in hepatocellular carcinoma cells (107). Other studies reinforcing these findings show a significant reduction in tumor volume and microvascular density associated with decreased lung (39) and colorectal (108) cancer metastasis with the use of an ACEI. The initial action of VEGF is similar in other tissues, increasing microvascular permeability and extracellular fibrin deposition, and subsequent degradation of the extracellular matrix (ECM). Next, endothelial cells migrate to the stroma of the circulating tissue, inducing the formation of enlarged, thin-walled vessels, called mother vessels. Angiogenesis can occur differently, with differentiation into smaller, intertwined, and disorganized daughter vessels, which connect to the mother vessels and are observed in benign and malignant tumors via VEGF-driven angiogenesis (109). Therefore, our *in vivo* study (**Figure 3**) corroborated the findings in the scientific literature (107, 110, 111) regarding significant inhibition of new vessel formation associated with reduced vessel caliber in oral carcinoma induced and treated with ACEI. These results indicate ACEI as a potential attenuator of tumor growth due to the presumed suppression of VEGF-induced angiogenesis in response to ACE inhibition and subsequent Ang II synthesis.

ACEI have other antitumor mechanisms. This includes reactions with matrix metalloproteinases (MMPs), since extracellular matrix degradation is critical for malignant tumor development, invasion, metastasis, and angiogenesis. MMPs belong to a family of endopeptidases and can collectively degrade all components of the ECM and basement membranes (112-115). Studies show ACEI (captopril) as an inhibitor of MMP activities (116). Captopril has a sulfhydryl group that can chelate zinc ions,

indicating a direct effect on MMP-2 and MMP-9 activities (117-120). This provides yet another benefit of treatment with ACEI to fight against invasive and metastatic carcinoma.

Studies show antagonistic effects of AT2R (angiotensin type 2 receptor) compared to AT1R (121) since AT2R has demonstrated antiangiogenic and pro-apoptotic effects, thus reducing endothelial cell migration and tube formation via inhibition of VEGFR2/FLK-1 signals (98). Furthermore, other studies have identified a new family of proteins and their interaction with AT2R, inhibiting Epidermal Growth Factor (EGF)-induced cell proliferation (122) and transporting AT2R to the plasma membrane (123). In several diseases, activation via ACE/Ang II/AT1R results in deleterious effects, including induction of vasoconstriction, inflammation, fibrosis, cell growth and migration, and fluid retention (124, 125). Further reinforcing this, AT1R has anti-apoptotic effects on microvascular endothelial cells, inducing expression of survivin, and thus reducing caspase 3 activity through activation of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway (126). Finally, activation of AT1R via Ang II has been shown to induce migration and subsequent invasion of choriocarcinoma cells (127). In contrast, AT2R stimulates VEGFR2-induced inhibition of Akt and endothelial synthase (e-NOS) phosphorylation, attenuating endothelial cell migration and vessel formation (98, 128). These results show the antagonistic effects of AT1R in relation to AT2R, which can account for the significant decrease in migration and invasive abilities in OSCC cells following interruption of AT1R activation via inhibition of Ang II and activation of AT2R by ACEI, since studies show that AT2R is constitutively active and does not depend on Ang II binding for its activation to mediate signal transduction events (129).

Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) is a bioactive component of the RAS and is formed endogenously in the circulation and several other tissues through Ang I and II enzymatic pathways (130, 131). Formation of Ang-(1-7) from Ang II is mediated by prolyl-endopeptidase (PEP), prolyl-carboxypeptidase (PCP), ACE2, or immediately formed from Ang I by hydrolysis by PEP and for neutral endopeptidase (NEP)(132, 133) or by Ang-(1-9) (131). Ang 1-7 interacts with its Mas receptor to antagonize the actions of Ang II, as shown in **Figure 5** (131, 134), scientific studies suggest that Ang1-7 signaling by MASR inhibits tumorigenesis, probably due to its effects on angiogenesis (135, 136). Assays in a mouse xenograft model show that Ang1-7 significantly reduced lung tumor growth and microvessel density, simultaneously with a significant reduction in VEGFA (135) expression, which was mediated by MASR

(136). Similarly, treatment with Ang1-7 reduced levels of cyclooxygenase 2 (COX2) (137), which is a pro-inflammatory molecule that is upregulated in certain types of cancers, with functions that include prostaglandin synthesis E2 (PGE 2) and leukocyte recruitment (138, 139). In contrast to Ang II/AT1R, the Ang1–7/MASR axis is an antiproliferative in cultured tumor cells, mediated by regression of ERK signaling (136). In vitro and in vivo assays reveal the decrease in parameters through the use of AT1R inhibitors and activation of the Ang1-7 system, and MASR is associated with tumor growth regression and vascularization of primary tumors and metastases in a variety of malignancies including breast cancer, lung, prostate, ovarian, bladder, gastric and renal cancer (39, 41, 70, 71, 97, 108, 135, 137, 140-154).. However, an increase in Ang-(1-7) was demonstrated in rats submitted to ACEI (155). Increased Ang-(1-7) plasma levels have shown favorable contributions to ACEI therapy (156).

Conclusion

Our in vitro and in vivo study results reveal that ACEI has an effect on carcinogenesis via several molecular pathways, and this study provides strong scientific evidence that inhibition of ACE can be a promising adjuvant therapeutic strategy in the treatment of OSCC.

Acknowledgment

We are grateful to all the teams at Hospital Clemente would (HU) and the health research laboratory for their indirect collaboration. And the funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) that contributed to the outcome of this work.

Conflicts of interest

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Organization IAfRoCWH. Global Cancer Observatory (GCO) [Available from: <https://gco.iarc.fr/>]
2. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(1):60-72.
3. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
4. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
5. Kaidar-Person O, Gil Z, Billan S. Precision medicine in head and neck cancer. *Drug Resist Updat.* 2018;40:13-6.
6. Crowder SL, Najam N, Sarma KP, Fiese BH, Arthur AE. Head and Neck Cancer Survivors' Experiences with Chronic Nutrition Impact Symptom Burden after Radiation: A Qualitative Study. *J Acad Nutr Diet.* 2020;120(10):1643-53.
7. Crowder SL, Douglas KG, Yanina Pepino M, Sarma KP, Arthur AE. Nutrition impact symptoms and associated outcomes in post-chemoradiotherapy head and neck cancer survivors: a systematic review. *J Cancer Surviv.* 2018;12(4):479-94.
8. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(3):386-96.
9. Crowder SL, Najam N, Sarma KP, Fiese BH, Arthur AE. Quality of life, coping strategies, and supportive care needs in head and neck cancer survivors: a qualitative study. *Support Care Cancer.* 2021;29(8):4349-56.
10. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020;18(7):873-98.
11. Budach W, Bolke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol.* 2016;118(2):238-43.
12. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008;264(3):224-36.
13. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;316(5):H958-H70.
14. Almutlaq M, Alamro AA, Alamri HS, Alghamdi AA, Barhoumi T. The Effect of Local Renin Angiotensin System in the Common Types of Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:736361.
15. Kilmister EJ, Tan ST. The Role of the Renin-Angiotensin System in the Cancer Stem Cell Niche. *J Histochem Cytochem.* 2021;69(12):835-47.
16. Nakamura K, Okuyama R, Kawakami Y. Renin-Angiotensin System in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1277:105-14.

17. Dolomatov S, Zukow W, Novikov N, Markaryan A, Ereemeeva E. Expression of the Renin-Angiotensin System Components in Oncologic Diseases. *Acta Clin Croat.* 2019;58(2):354-64.
18. Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millan S, Sanchez-Corona J. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(2):227-33.
19. Uemura H. Role of renin-angiotensin system (RAS) in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(4):393.
20. Sipahi I, Chou J, Mishra P, Debanne SM, Simon DI, Fang JC. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cancer risk. *Am J Cardiol.* 2011;108(2):294-301.
21. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(7):293-9.
22. Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S. Angiotensin II stimulation of Na⁺/K⁺ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells. *J Endocrinol.* 2002;173(2):315-23.
23. Nadal JA, Scicli GM, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H739-48.
24. Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, et al. Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(2):245-55.
25. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1401(2):187-94.
26. Ishikane S, Takahashi-Yanaga F. The role of angiotensin II in cancer metastasis: Potential of renin-angiotensin system blockade as a treatment for cancer metastasis. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:96-103.
27. Helgeson SA, Waddle MR, Burnside RC, Debella YT, Lee AS, Burger CD, et al. Association between Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers and Lung Cancer. *South Med J.* 2021;114(9):607-13.
28. de Miranda FS, Guimaraes JPT, Menikdiwela KR, Mabry B, Dhakal R, Rahman RL, et al. Breast cancer and the renin-angiotensin system (RAS): Therapeutic approaches and related metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;528:111245.
29. Khoshghamat N, Jafari N, Toloue-Pouya V, Azami S, Mirnourbakhsh SH, Khazaei M, et al. The therapeutic potential of renin-angiotensin system inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Life Sci.* 2021;270:119118.
30. Chen X, Yi CH, Ya KG. Renin-angiotensin system inhibitor use and colorectal cancer risk and mortality: A dose-response meta analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2020;21(3):1470320319895646.
31. Ozawa T, Hashiguchi Y, Yagi T, Fukushima Y, Shimada R, Hayama T, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blockers may

reduce tumor recurrence in left-sided and early colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis.* 2019;34(10):1731-9.

32. Barone M, Viggiani MT, Losurdo G, Principi M, Leo AD. Systematic review: Renin-angiotensin system inhibitors in chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2019;25(20):2524-38.

33. Asgharzadeh F, Hassanian SM, Ferns GA, Khazaei M, Hasanzadeh M. The Therapeutic Potential of Angiotensin-converting Enzyme and Angiotensin Receptor Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer: Rational Strategies and Recent Progress. *Curr Pharm Des.* 2018;24(39):4652-8.

34. Raebel MA, Zeng C, Cheetham TC, Smith DH, Feigelson HS, Carroll NM, et al. Risk of Breast Cancer With Long-Term Use of Calcium Channel Blockers or Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Among Older Women. *Am J Epidemiol.* 2017;185(4):264-73.

35. Mao Y, Xu X, Wang X, Zheng X, Xie L. Is angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers therapy protective against prostate cancer? *Oncotarget.* 2016;7(6):6765-73.

36. McKay RR, Rodriguez GE, Lin X, Kaymakcalan MD, Hamnvik OP, Sabbisetti VS, et al. Angiotensin system inhibitors and survival outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(11):2471-9.

37. Lau ST, Leung PS. Role of the RAS in pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(4):412-20.

38. Moscarelli L, Zanazzi M, Mancini G, Rossi E, Caroti L, Rosso G, et al. Keratinocyte cancer prevention with ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers or their combination in renal transplant recipients. *Clin Nephrol.* 2010;73(6):439-45.

39. Attoub S, Gaben AM, Al-Salam S, Al Sultan MA, John A, Nicholls MG, et al. Captopril as a potential inhibitor of lung tumor growth and metastasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1138:65-72.

40. Christian JB, Lapane KL, Hume AL, Eaton CB, Weinstock MA, Trial V. Association of ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers with keratinocyte cancer prevention in the randomized VATTC trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(17):1223-32.

41. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(2):441-7.

42. Guimaraes TA, Farias LC, Santos ES, de Carvalho Fraga CA, Orsini LA, de Freitas Teles L, et al. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1alpha under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(34):55057-68.

43. da Rocha RG, Santos EMS, Santos EM, Gomes ESB, Ramos GV, Aguiar KM, et al. Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* 2019;48(1):17-23.

44. Ghorbani-Anarkooli M, Dabirian S, Zendedel A, Moladoust H, Bahadori MH. Effects of melatonin on the toxicity and proliferation of human anaplastic thyroid cancer cell line. *Acta Histochem.* 2021;123(3):151700.

45. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16(8):1093-107.
46. Chen H, Sa G, Li L, He S, Wu T. In vitro and in vivo synergistic anti-tumor effect of LIN28 inhibitor and metformin in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol.* 2021;891:173757.
47. Guimaraes TA, Farias LC, Fraga CA, Feltenberger JD, Melo GA, Coletta RD, et al. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs.* 2016;27(5):407-16.
48. Bravo-Calderon DM, Assao A, Garcia NG, Coutinho-Camillo CM, Roffe M, Germano JN, et al. Beta adrenergic receptor activation inhibits oral cancer migration and invasiveness. *Arch Oral Biol.* 2020;118:104865.
49. Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP, et al. Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: how it really works. *J Vis Exp.* 2009(33).
50. Araujo WF, Naves MA, Ravanini JN, Schor N, Teixeira VP. Renin-angiotensin system (RAS) blockade attenuates growth and metastatic potential of renal cell carcinoma in mice. *Urol Oncol.* 2015;33(9):389 e1-7.
51. Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA, Gutkind JS. Targeting mammalian target of rapamycin by rapamycin prevents tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(1):27-36.
52. de Souza MG, Gomes ESB, Costa LB, Andrade ADS, de Jesus SF, de Paula DPS, et al. Might anxiety disorders promote head and neck cancer development? *IBRO Rep.* 2020;9:9-13.
53. Ferreira CA, Ni D, Rosenkrans ZT, Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res.* 2018;11(10):4955-84.
54. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. [Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death]. *Postepy Biochem.* 2006;52(2):145-56.
55. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5080843.
56. Bikfalvi A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis.* 2017;20(4):463-78.
57. Viallard C, Larrivee B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017;20(4):409-26.
58. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):417-27.
59. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000;52(2):237-68.
60. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.

61. Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, de Oliveira JT, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:919570.
62. Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, Deremer DL, Somanath PR. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy*. 2012;32(12):1095-111.
63. Cao Y, Liu Q. Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis. *Adv Cancer Res*. 2007;97:203-24.
64. Heath VL, Bicknell R. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(7):395-404.
65. Chen L, Wang S, Feng Y, Zhang J, Du Y, Zhang J, et al. Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. *Cells*. 2021;10(2).
66. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*. 2017;70:97-101.
67. Victorelli FD, Cardoso VMO, Ferreira NN, Calixto GMF, Fontana CR, Baltazar F, et al. Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable in vivo model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020;153:273-84.
68. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res*. 2014;328(2):314-24.
69. Fernando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 1:11-8.
70. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest*. 2003;112(1):67-75.
71. Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Asano T, Seta K, Kawai T, et al. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2002;62(15):4176-9.
72. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72.
73. Arrieta O, Guevara P, Escobar E, Garcia-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *Br J Cancer*. 2005;92(7):1247-52.
74. Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(11):1139-47.
75. Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Lett*. 2001;495(3):197-200.
76. Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, et al. Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and

epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2003;196(2):370-7.

77. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(4):1229-34.

78. Farias LC, Fraga CA, De Oliveira MV, Silva TF, Marques-Silva L, Moreira PR, et al. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol.* 2010;37(1):167-76.

79. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-28.

80. Han CD, Ge WS. Up-Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Enhances Cell Proliferation and Predicts Poor Prognosis in Laryngeal Cancer. *Med Sci Monit.* 2016;22:4132-8.

81. Featherston T, Yu HH, Dunne JC, Chibnall AM, Brasch HD, Davis PF, et al. Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Buccal Mucosal Squamous Cell Carcinoma Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg.* 2016;3:52.

82. Grzegorzolka J, Swiatko K, Pula B, Zamirska A, Olbromski M, Bieniek A, et al. ACE and ACE2 expression in normal and malignant skin lesions. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(3):232-8.

83. Vairaktaris E, Yapijakis C, Tsigris C, Vassiliou S, Derka S, Nkenke E, et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with increased risk for oral cancer. *Acta Oncol.* 2007;46(8):1097-102.

84. Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, et al. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130(10):567-73.

85. Rocken C, Rohl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al. The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(6):1206-12.

86. Kumar J, Teoh SL, Das S, Mahaknaukrah P. Oxidative Stress in Oral Diseases: Understanding Its Relation with Other Systemic Diseases. *Front Physiol.* 2017;8:693.

87. Ansari SS, Sharma AK, Soni H, Ali DM, Tews B, Konig R, et al. Induction of ER and mitochondrial stress by the alkylphosphocholine erufosine in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):296.

88. Dias RB, de Araujo TBS, de Freitas RD, Rodrigues A, Sousa LP, Sales CBS, et al. beta-Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;126:87-100.

89. Chang YT, Huang CY, Tang JY, Liaw CC, Li RN, Liu JR, et al. Reactive oxygen species mediate soft corals-derived sinuleptolide-induced antiproliferation and DNA damage in oral cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3289-97.
90. Chang YT, Wu CY, Tang JY, Huang CY, Liaw CC, Wu SH, et al. Sinularin induces oxidative stress-mediated G2/M arrest and apoptosis in oral cancer cells. *Environ Toxicol.* 2017;32(9):2124-32.
91. Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death Dis.* 2019;10(11):822.
92. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060-72.
93. Holtz DO, Kraffy RT, Mohamed-Hadley A, Zhang L, Alagkiozidis I, Leiby B, et al. Should tumor VEGF expression influence decisions on combining low-dose chemotherapy with antiangiogenic therapy? Preclinical modeling in ovarian cancer. *J Transl Med.* 2008;6:2.
94. Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol.* 2008;32(1):41-8.
95. Kamat AA, Merritt WM, Coffey D, Lin YG, Patel PR, Broaddus R, et al. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7487-95.
96. Delongchamps NB, Peyromaure M. The role of vascular endothelial growth factor in kidney and prostate cancer. *Can J Urol.* 2007;14(5):3669-77.
97. Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, et al. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2686-94.
98. Benndorf R, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res.* 2003;93(5):438-47.
99. Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N, Benessiano J, Duriez M, deGasparo M, et al. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension.* 2002;39(3):830-5.
100. Kikkawa F, Mizuno M, Shibata K, Kajiyama H, Morita T, Ino K, et al. Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(5):1258-63.
101. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res.* 1991;68(2):450-6.
102. Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med.* 1985;105(2):141-5.

103. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Fukui H. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors as potential anti-angiogenic agents for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4(7):555-67.
104. Chen L, Re RN, Prakash O, Mondal D. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;196(3):280-3.
105. Lau K, Bicknell R. Antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther*. 1999;6(11):1793-5.
106. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*. 1999;5(12):1359-64.
107. Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 2001;7(4):1073-8.
108. Neo JH, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(4):577-84.
109. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2000;80(1):99-115.
110. Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, et al. Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2003;9(16 Pt 1):6038-45.
111. Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Tsujinoue H, et al. Suppression of the renin-angiotensin system attenuates vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2002;20(6):1227-31.
112. Roy R, Morad G, Jedinak A, Moses MA. Metalloproteinases and their roles in human cancer. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020;303(6):1557-72.
113. Javadian M, Gharibi T, Shekari N, Abdollahpour-Alitappeh M, Mohammadi A, Hossieni A, et al. The role of microRNAs regulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer development, progression, and metastasis. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5399-412.
114. Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, Hitesh, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*. 2016;12(1):28-35.
115. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
116. Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D. Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;81(5):761-6.
117. Pinheiro L, Perdomo-Pantoja A, Casaos J, Huq S, Paldor I, Vigilar V, et al. Captopril inhibits Matrix Metalloproteinase-2 and extends survival as a temozolomide

adjuvant in an intracranial gliosarcoma model. *Clin Neurol Neurosurg.* 2021;207:106771.

118. Kast RE, Halatsch ME. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in glioblastoma: a trio of old drugs-captopril, disulfiram and nelfinavir-are inhibitors with potential as adjunctive treatments in glioblastoma. *Arch Med Res.* 2012;43(3):243-7.

119. Yamamoto D, Takai S, Miyazaki M. Inhibitory profiles of captopril on matrix metalloproteinase-9 activity. *Eur J Pharmacol.* 2008;588(2-3):277-9.

120. Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31(9):1042-50.

121. Berk BC. Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin. *Sci STKE.* 2003;2003(181):PE16.

122. Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, et al. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem.* 2004;279(28):28989-97.

123. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, et al. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):57-64.

124. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C82-97.

125. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):11-34.

126. Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res.* 2004;94(6):785-93.

127. Ishimatsu S, Itakura A, Okada M, Kotani T, Iwase A, Kajiyama H, et al. Angiotensin II augmented migration and invasion of choriocarcinoma cells involves PI3K activation through the AT1 receptor. *Placenta.* 2006;27(6-7):587-91.

128. Cheng Q, Zhou L, Zhou J, Wan H, Li Q, Feng Y. ACE2 overexpression inhibits acquired platinum resistance-induced tumor angiogenesis in NSCLC. *Oncol Rep.* 2016;36(3):1403-10.

129. Miura S, Karnik SS. Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J.* 2000;19(15):4026-35.

130. Chappell MC, Diz DI, Yunis C, Ferrario CM. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl.* 1998;68:S3-6.

131. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1998;31(1 Pt 2):362-7.

132. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008;93(5):519-27.

133. Touyz RM. Chapter 14 - Blood Pressure Regulation and Pathology. In: Willis MS, Homeister JW, Stone JR, editors. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 257-75.
134. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):745-59.
135. Soto-Pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(6):1676-83.
136. Gallagher PE, Tallant EA. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*. 2004;25(11):2045-52.
137. Menon J, Soto-Pantoja DR, Callahan MF, Cline JM, Ferrario CM, Tallant EA, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Res*. 2007;67(6):2809-15.
138. Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin Cancer Res*. 2003;9(5):1604-10.
139. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998;58(6):1208-16.
140. Cambados N, Walther T, Nahmod K, Tocci JM, Rubinstein N, Bohme I, et al. Angiotensin-(1-7) counteracts the transforming effects triggered by angiotensin II in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(51):88475-87.
141. Yu C, Tang W, Wang Y, Shen Q, Wang B, Cai C, et al. Downregulation of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis promotes breast cancer metastasis by enhancing store-operated calcium entry. *Cancer Lett*. 2016;376(2):268-77.
142. Krishnan B, Smith TL, Dubey P, Zapadka ME, Torti FM, Willingham MC, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates metastatic prostate cancer and reduces osteoclastogenesis. *Prostate*. 2013;73(1):71-82.
143. Ni L, Feng Y, Wan H, Ma Q, Fan L, Qian Y, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits the migration and invasion of A549 human lung adenocarcinoma cells through inactivation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Oncol Rep*. 2012;27(3):783-90.
144. Cook KL, Metheny-Barlow LJ, Tallant EA, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. *Cancer Res*. 2010;70(21):8319-28.
145. Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*. 2010;10:134.
146. Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CM, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(1):79-87.
147. Wang L, Cai SR, Zhang CH, He YL, Zhan WH, Wu H, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers

on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(21):2167-71.

148. Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF. Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci*. 2008;53(5):1206-10.

149. Kosaka T, Miyajima A, Takayama E, Kikuchi E, Nakashima J, Ohigashi T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(1):41-9.

150. Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(9):2888-93.

151. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):271-9.

152. Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte-Rojo A, Sotelo J. AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *Br J Cancer*. 2001;85(9):1396-9.

153. Hii SI, Nicol DL, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1998;77(6):880-3.

154. Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, et al. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest*. 1996;98(3):671-9.

155. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int*. 2005;68(5):2189-96.

156. Simoes e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):477-92.

Experimental design / Carcinoma induction and treatment

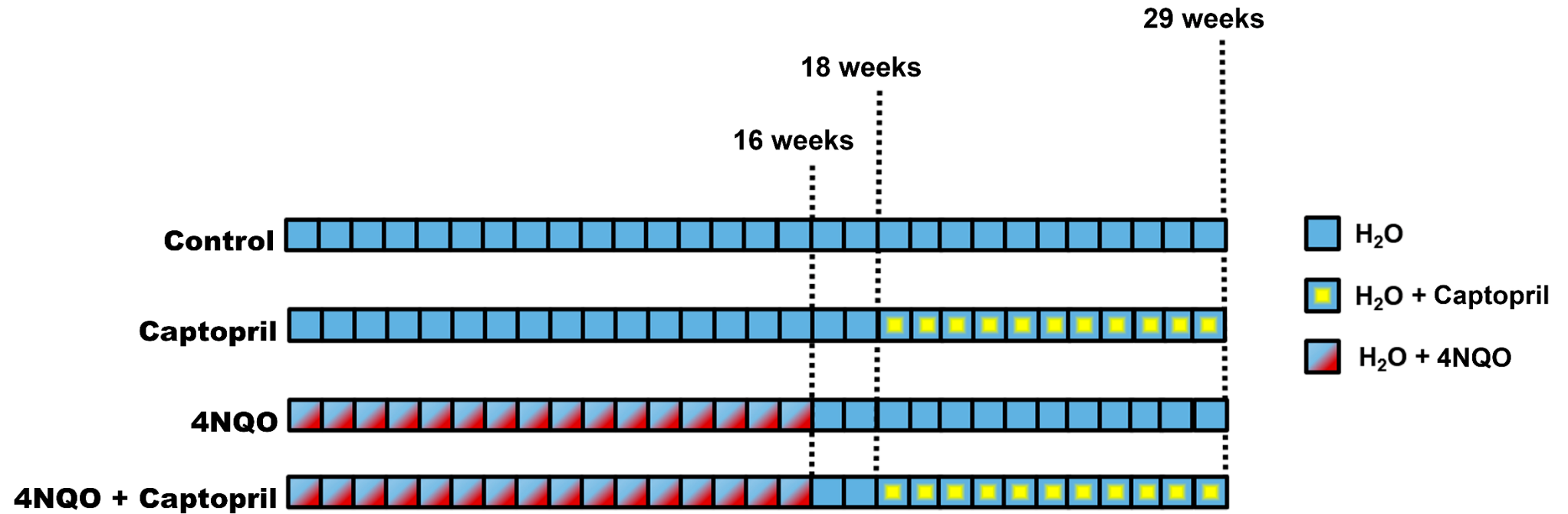


Figure 1. Experimental design illustrating the oral carcinoma induction by 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) and the treatment by captopril. The schematic displays four groups and their drug exposures across quadrants. Each quadrant represents one week of treatment.

IN VITRO EXPERIMENTS

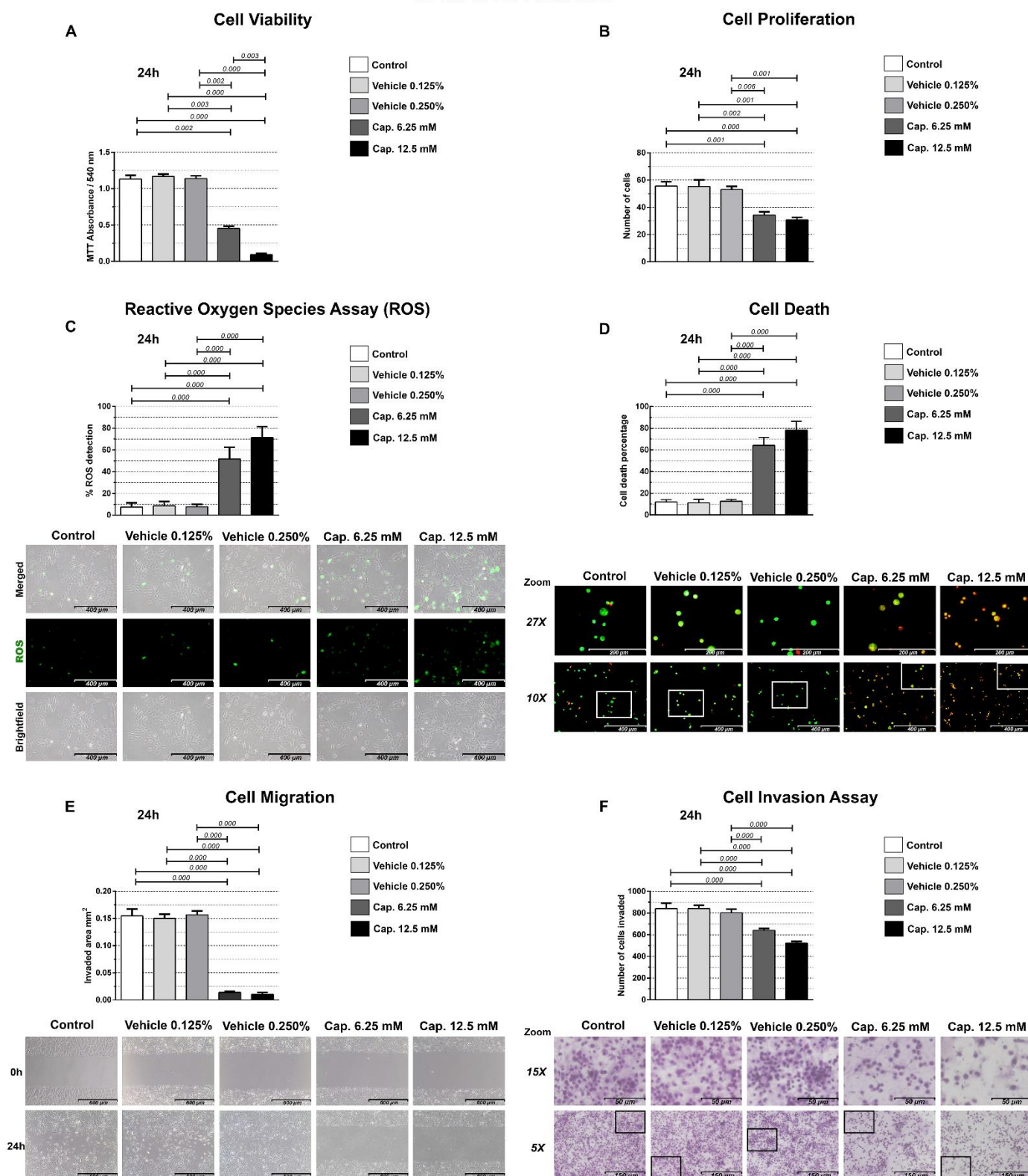


Figure 2. All assays shown in the present figure used captopril at concentrations of 6.25 mM and 12.5 mM as treatment, and the vehicles for their corresponding dilutions at concentrations of 0.125 and 0.250% of DMSO (dimethylsulfoxide), and the control group without captopril and DMSO. Probability values <0.05 were considered statistically significant for all tests. (A) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was performed to assess cell viability in captopril-treated SCC9 cells for 24 h. The results show a significant reduction with different concentrations of ACEI (angiotensin-converting enzyme inhibitor) when compared with the control and vehicle groups. (B) Proliferation assay was performed to measure the proliferation

ability of captopril-treated SCC9 cells. The data showed a significant reduction in the ACEI-treated groups compared to the untreated groups. The proliferation assay suggests that captopril has an antiproliferative effect in OSCC (oral squamous cell carcinoma) cells. (C) ROS (reactive oxygen species) assay. Graph and representative images showing the percent levels of intracellular ROS in captopril-treated SCC9 cells. A significant increase in the proportion of ROS positive cells (green fluorescent cells/blended field) was observed in the ACEI-treated groups compared to the untreated groups. Scale bar: 400 μm . (D) AO/EB (acridine orange/ethidium bromide) dual staining cell death assay for morphological detection of apoptotic SCC9 cells. The images and quantifications illustrate the significant increase in early (greenish-yellow fluorescent cells) and late (reddish-orange fluorescent cells) apoptosis in the captopril-treated groups compared to the other groups. Showing an induction of apoptosis through ACEI in OSCC cells. Images were taken at 10 and 27X magnification with scale bars of 400 and 200 μm , respectively. (E) Representative images of the wound healing assay and corresponding quantification, showing significant differences in the SCC9 cell migration ability in untreated and captopril-treated groups. The images were taken at 0 and 24 h after scraping to open wounds. Scale bar: 600 μm . (F) Representative illustration and quantification of captopril-treated SCC9 cells in the transwell invasion assay, showing that invasiveness of cells across membrane pores significantly attenuates after 24 h of treatment with ACEI when compared to the control and vehicle groups. The images were taken at 5 and 15X magnification with scale bars of 150 and 50 μm , respectively.

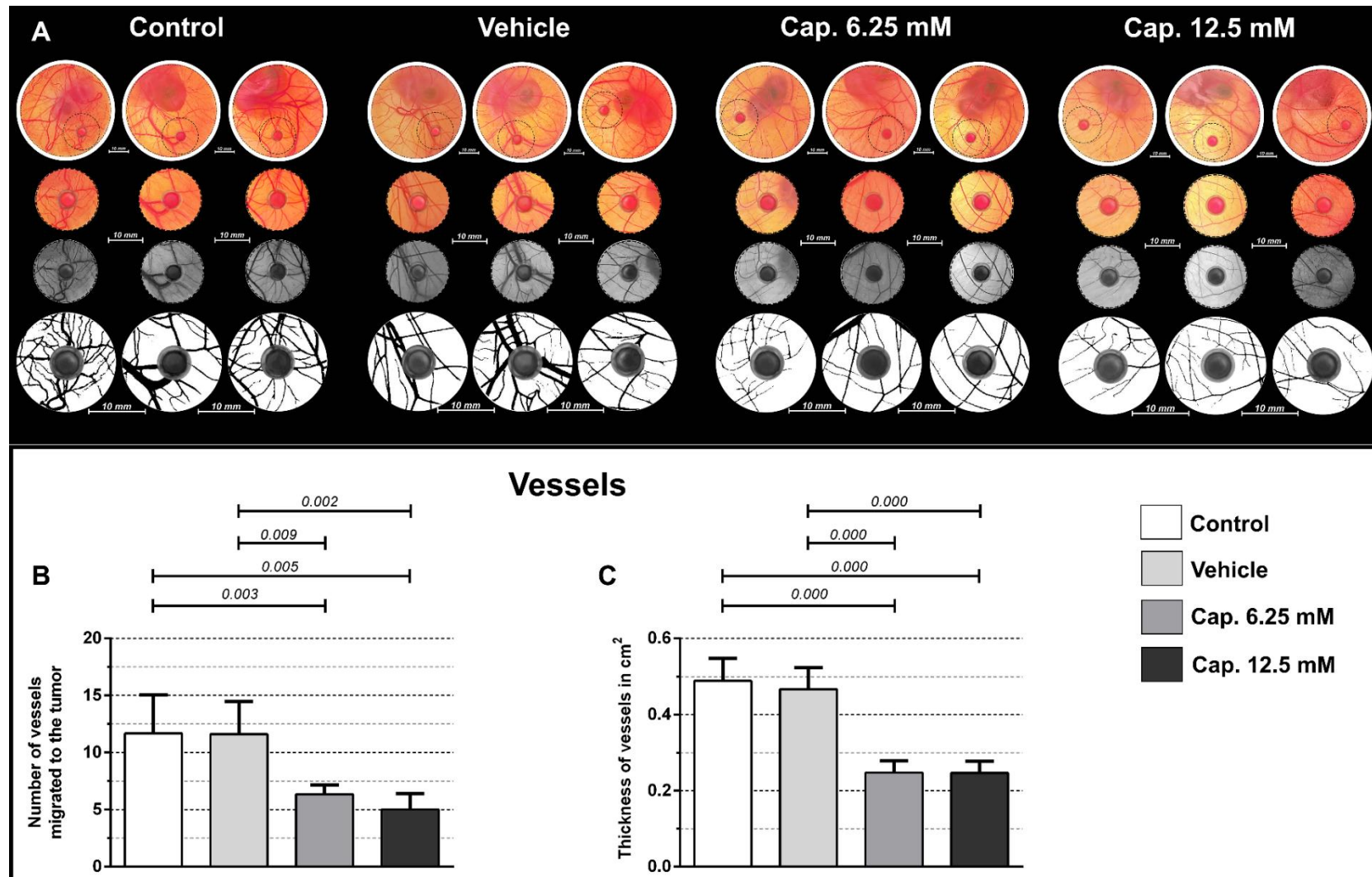
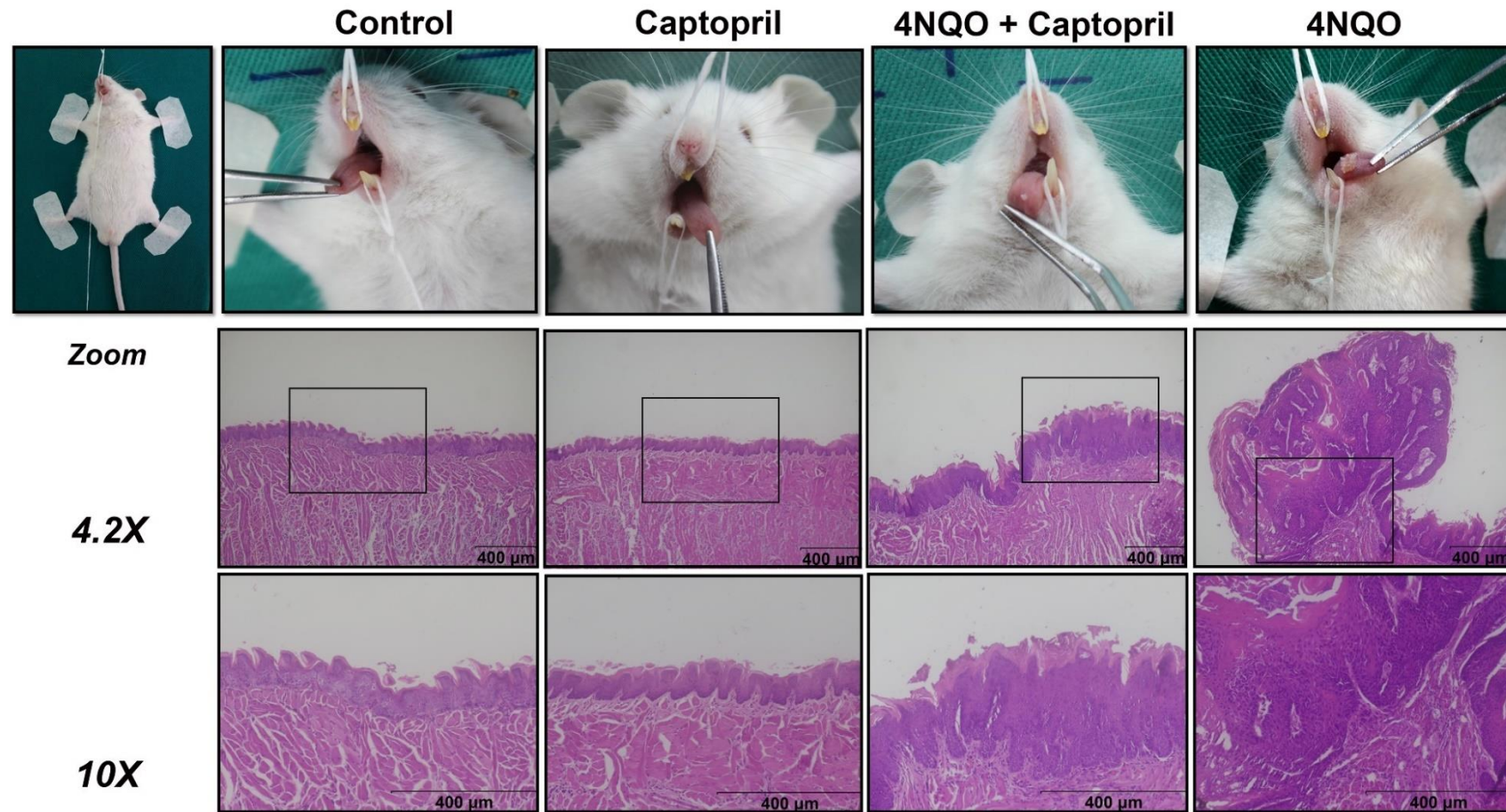


Figure 3. Experimental in vivo CAM (chorioallantoic membrane) assay. (A) Representative images at different magnifications and contrasts showing the antiangiogenic effect in the tumor environment following treatment with captopril at concentrations of 6.25 mM and 12.5 mM in the chick CAM after 10 days of incubation. Scale bar: 10 mm. (B) Quantitative results of the mean number of blood vessels migrated to the tumor region and the significant differences between untreated and ACEI-treated groups. (C) Quantification of vessel thickness in cm², showing a significant reduction in vessel density in the tumor environment in the treated groups compared to the control and vehicle groups (0.250% DMSO). Statistical significance for $p < 0.05$.



		Histological Gradations									
		Dysplasia Absent			Dysplasia Mild / Moderate			Severe Dysplasia / Carcinoma			
		Count	Row N%	Colum n N %	Count	Row N%	Colum n N %	Count	Row N%	Colum n N %	p-value
Group	Control	10	100,0%	50,0%	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	p<0.001
	Captopril	10	100,0%	50,0%	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	
	4NQO	0	0,0%	0,0%	2	20,0%	28,6%	8	80,0%	61,5%	
	Captopril + 4NQO	0	0,0%	0,0%	5	50,0%	71,4%	5	50,0%	38,5%	

Figure 4. (A) Representative image of the morphological parameters of the tongue by histology in the different experimental groups. Magnification: 4.2 and 10X. Scale bar: 400 µm. (B) Table with the classification and categorization of the animals based on morphological grades. An association with captopril is shown in the groups where carcinogenesis was induced.

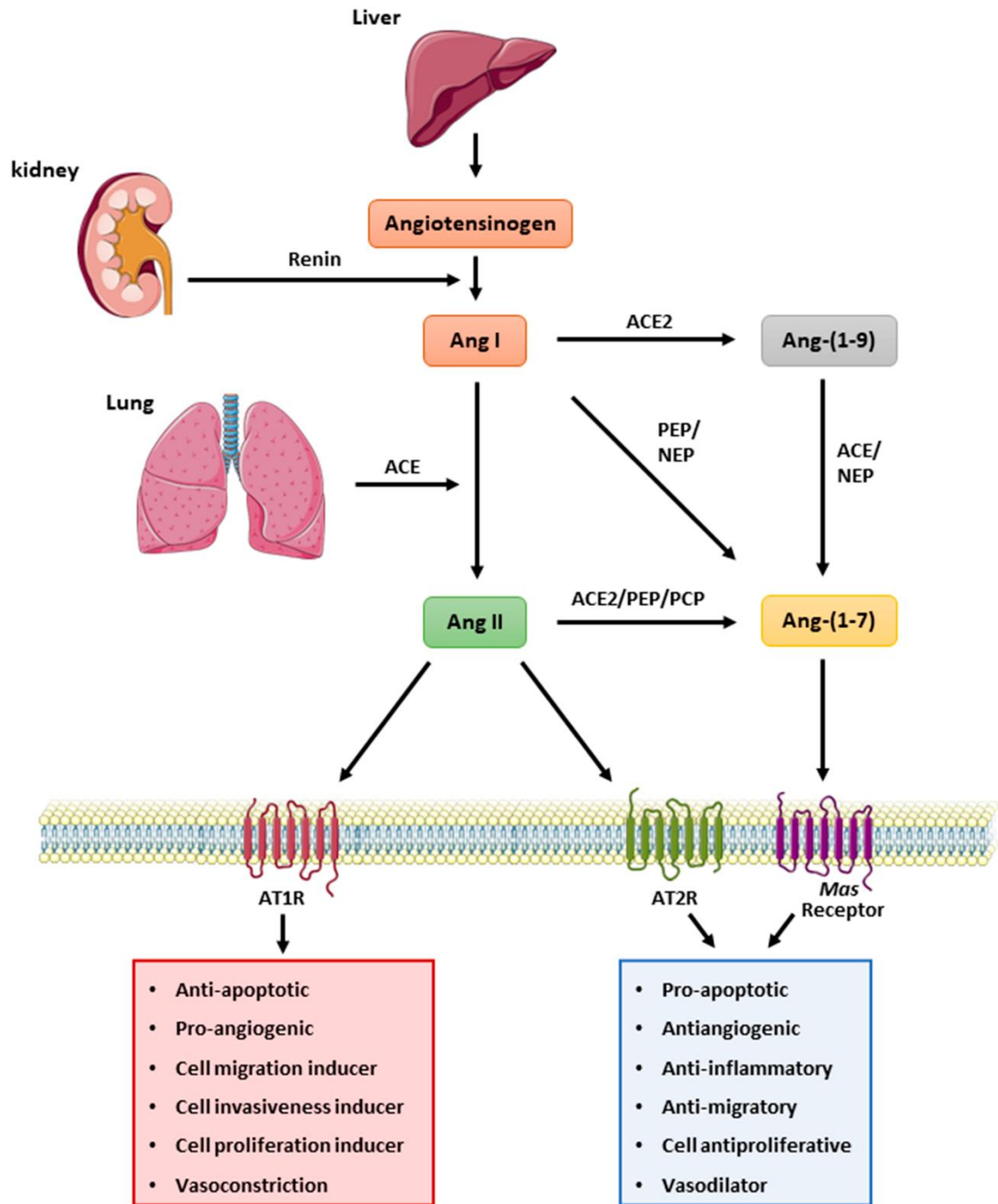
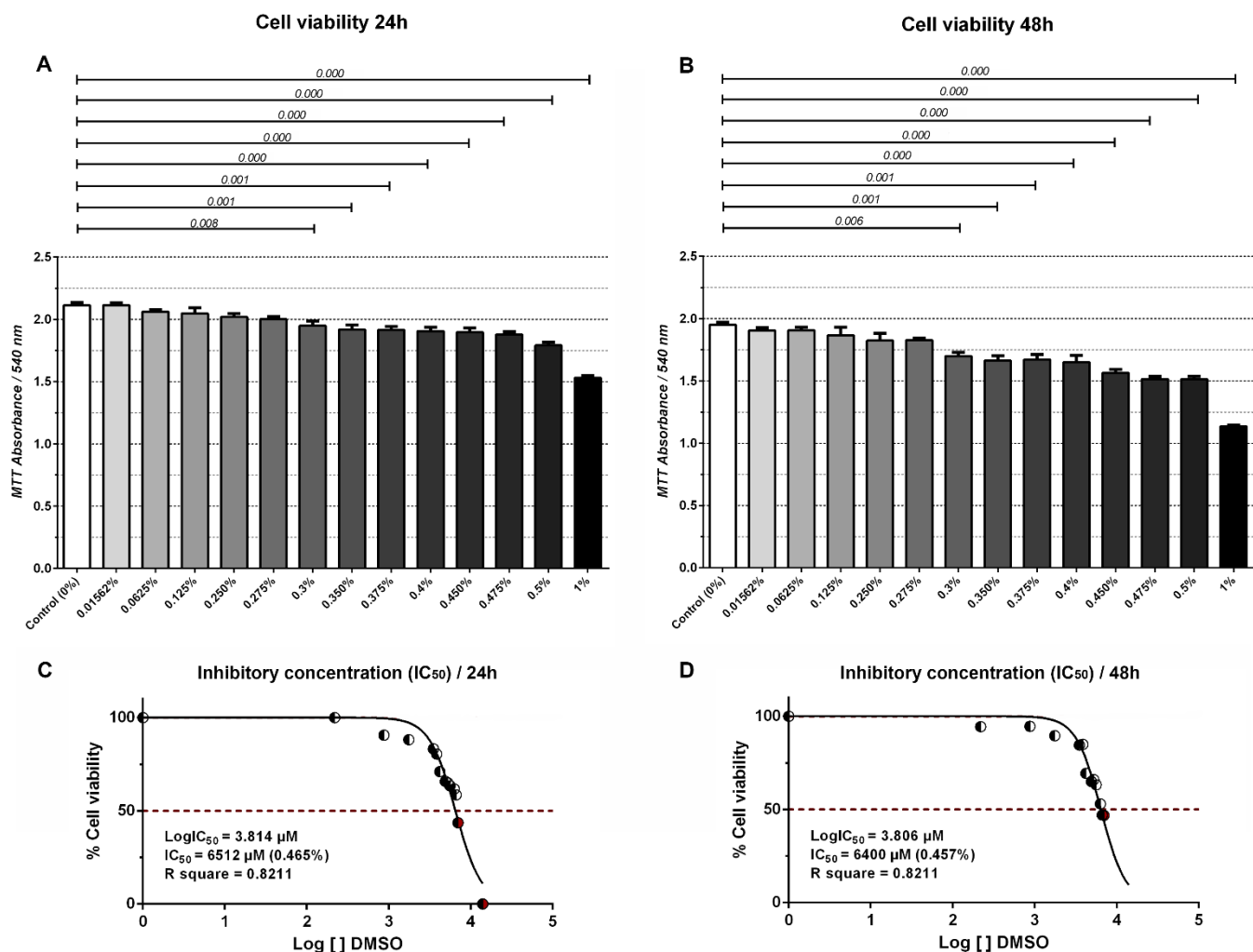


Figure 5. Renin-angiotensin system (RAS). The classic RAS involves the production of the enzyme renin in the kidney, which then cleaves the peptide angiotensinogen produced in the liver into the decapeptide Ang I (angiotensin I), which in turn converts Ang I to Ang II (angiotensin II) through the ACE (angiotensin-converting enzyme) generated in the lungs. Induced formation of Ang I to Ang-(1-9) (angiotensin 1-9) via ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2); production of Ang-(1-7) (angiotensin 1-7) by conversion of Ang-(1-9) through ACE and NEP (neutral endopeptidase); and formation of Ang-(1-7) directly from Ang I through PEP (prolyl-endopeptidase) and NEP; and again, production of Ang-(1-7) through PEP, PCP (prolyl-carboxypeptidase) and ACE2; Activation of AT1R (angiotensin type 1 receptor) and AT2R (angiotensin type 2 receptor) via Ang II and activation of the Mas receptor via Ang-(1-7). Pro-apoptotic, antiangiogenic, anti-inflammatory, anti-migratory, antiproliferative, and vasodilator mechanisms through AT2R and Mas receptor activation. However, opposite effects are observed in the activation of AT1R, which suppresses the effects of apoptosis, and stimulates angiogenesis, migration, invasion, cell proliferation, and vasoconstriction.

Viability of SCC9 cells in DMSO



Supplementary material 1. The cytotoxic effects of DMSO at various concentrations from 0 to 1% on SCC9 cells by 24 and 48 h analyzes were determined using the MTT assay. Based on MTT assays, a concentration range of 0.015 – 0.275% showed no significant difference compared to the control (0% DMSO) (A, B), these results did not demonstrate significant cytotoxic effects at previous concentrations on cell line viability SCC9. The inhibitory concentration test (IC₅₀) of DMSO in SCC9 cells was performed on the data obtained at 24 and 48 hours to contribute to the determination of non-toxic doses in cells. The 24h data (C) revealed an IC₅₀ of 6512 μ M (0.465% DMSO) and an IC₅₀ of 6400 μ M (0.457% DMSO) at the time point of 48 h (D). From these findings, the concentrations 0.125 and 0.250% were chosen as the vehicle for subsequent experiments.

Supplementary material 2.

<https://youtu.be/YKfHxBLBGlo>

6 REFERÊNCIAS

1. Organization WH. [Available from: <https://www.who.int/>].
2. Organization IAfRoCWH. Global Cancer Observatory (GCO) [Available from: <https://gco.iarc.fr/>].
3. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, Edefonti V, Garavello W, Levi F, et al. Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: the end of an epidemic? *Oral Oncol.* 2011;47(5):400-7.
4. Lopez RV, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control.* 2014;25(4):461-71.
5. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(3):e306-11.
6. Lajiou P AJ, MacMahon B, Trichopoulos D. Measures and estimates of cancer burden. 2° ed. Oxford University Press: Textbook of cancer epidemiology; 2008.
7. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020;18(7):873-98.
8. Budach W, Bolke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol.* 2016;118(2):238-43.
9. NIH NCI. NCI dictionary of cancer terms [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/quality-of-life?redirect=true>].
10. Rosenthal DI, Lewin JS, Eisbruch A. Prevention and treatment of dysphagia and aspiration after chemoradiation for head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(17):2636-43.
11. Lazarus CL, Husaini H, Hu K, Culliney B, Li Z, Urken M, et al. Functional outcomes and quality of life after chemoradiotherapy: baseline and 3 and 6 months post-treatment. *Dysphagia.* 2014;29(3):365-75.
12. Patterson JM, McColl E, Wilson J, Carding P, Rapley T. Head and neck cancer patients' perceptions of swallowing following chemoradiotherapy. *Support Care Cancer.* 2015;23(12):3531-8.
13. Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW, Lazarus CL, Gaziano J, Stachowiak L, et al. Swallowing disorders in the first year after radiation and chemoradiation. *Head Neck.* 2008;30(2):148-58.
14. Crowder SL, Fruge AD, Douglas KG, Chen YT, Moody L, Delk-Licata A, et al. Feasibility Outcomes of a Pilot Randomized Clinical Trial to Increase Cruciferous and Green Leafy Vegetable Intake in Posttreatment Head and Neck Cancer Survivors. *J Acad Nutr Diet.* 2019;119(4):659-71.

15. Crowder SL, Douglas KG, Yanina Pepino M, Sarma KP, Arthur AE. Nutrition impact symptoms and associated outcomes in post-chemoradiotherapy head and neck cancer survivors: a systematic review. *J Cancer Surviv.* 2018;12(4):479-94.
16. Sutura P, Clump DA, Kalash R, D'Ambrosio D, Mihai A, Wang H, et al. Initial Results of a Multicenter Phase 2 Trial of Stereotactic Ablative Radiation Therapy for Oligometastatic Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;103(1):116-22.
17. McQuestion M, Fitch M, Howell D. The changed meaning of food: Physical, social and emotional loss for patients having received radiation treatment for head and neck cancer. *Eur J Oncol Nurs.* 2011;15(2):145-51.
18. Ganzer H, Rothpletz-Puglia P, Byham-Gray L, Murphy BA, Touger-Decker R. The eating experience in long-term survivors of head and neck cancer: a mixed-methods study. *Support Care Cancer.* 2015;23(11):3257-68.
19. Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol.* 2021;121:105451.
20. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(1):60-72.
21. Li H, Weatherford ET, Davis DR, Keen HL, Grobe JL, Daugherty A, et al. Renal proximal tubule angiotensin AT1A receptors regulate blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(4):R1067-77.
22. Allen AM. Role of angiotensin in the rostral ventrolateral medulla in the development and maintenance of hypertension. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(2):117-23.
23. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):415-72.
24. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens.* 2000;13(1 Pt 2):31S-8S.
25. Haznedaroglu IC, Malkan UY. Local bone marrow renin-angiotensin system in the genesis of leukemia and other malignancies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(19):4089-111.
26. Hanif K, Bid HK, Konwar R. Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertens Res.* 2010;33(1):11-21.
27. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1675-84.
28. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(7):293-9.
29. Sipahi I, Chou J, Mishra P, Debanne SM, Simon DI, Fang JC. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cancer risk. *Am J Cardiol.* 2011;108(2):294-301.
30. Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S. Angiotensin II stimulation of Na⁺/K⁺ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells. *J Endocrinol.* 2002;173(2):315-23.

31. Nadal JA, Scicli GM, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H739-48.
32. Ishikane S, Takahashi-Yanaga F. The role of angiotensin II in cancer metastasis: Potential of renin-angiotensin system blockade as a treatment for cancer metastasis. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:96-103.
33. Helgeson SA, Waddle MR, Burnside RC, Debella YT, Lee AS, Burger CD, et al. Association between Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers and Lung Cancer. *South Med J.* 2021;114(9):607-13.
34. de Miranda FS, Guimaraes JPT, Menikdiwela KR, Mabry B, Dhakal R, Rahman RL, et al. Breast cancer and the renin-angiotensin system (RAS): Therapeutic approaches and related metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;528:111245.
35. Khoshghamat N, Jafari N, Toloue-Pouya V, Azami S, Mirnourbakhsh SH, Khazaei M, et al. The therapeutic potential of renin-angiotensin system inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Life Sci.* 2021;270:119118.
36. Chen X, Yi CH, Ya KG. Renin-angiotensin system inhibitor use and colorectal cancer risk and mortality: A dose-response meta analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2020;21(3):1470320319895646.
37. Ozawa T, Hashiguchi Y, Yagi T, Fukushima Y, Shimada R, Hayama T, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blockers may reduce tumor recurrence in left-sided and early colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis.* 2019;34(10):1731-9.
38. Barone M, Viggiani MT, Losurdo G, Principi M, Leo AD. Systematic review: Renin-angiotensin system inhibitors in chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2019;25(20):2524-38.
39. Asgharzadeh F, Hassanian SM, Ferns GA, Khazaei M, Hasanzadeh M. The Therapeutic Potential of Angiotensin-converting Enzyme and Angiotensin Receptor Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer: Rational Strategies and Recent Progress. *Curr Pharm Des.* 2018;24(39):4652-8.
40. Raebel MA, Zeng C, Cheetham TC, Smith DH, Feigelson HS, Carroll NM, et al. Risk of Breast Cancer With Long-Term Use of Calcium Channel Blockers or Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Among Older Women. *Am J Epidemiol.* 2017;185(4):264-73.
41. Mao Y, Xu X, Wang X, Zheng X, Xie L. Is angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers therapy protective against prostate cancer? *Oncotarget.* 2016;7(6):6765-73.
42. McKay RR, Rodriguez GE, Lin X, Kaymakcalan MD, Hamnvik OP, Sabbisetti VS, et al. Angiotensin system inhibitors and survival outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(11):2471-9.
43. Lau ST, Leung PS. Role of the RAS in pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(4):412-20.
44. Moscarelli L, Zanazzi M, Mancini G, Rossi E, Caroti L, Rosso G, et al. Keratinocyte cancer prevention with ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers or their combination in renal transplant recipients. *Clin Nephrol.* 2010;73(6):439-45.

45. Attoub S, Gaben AM, Al-Salam S, Al Sultan MA, John A, Nicholls MG, et al. Captopril as a potential inhibitor of lung tumor growth and metastasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1138:65-72.
46. Christian JB, Lapane KL, Hume AL, Eaton CB, Weinstock MA, Trial V. Association of ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers with keratinocyte cancer prevention in the randomized VATTC trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(17):1223-32.
47. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(2):441-7.
48. Pare A, Joly A. [Oral cancer: Risk factors and management]. *Presse Med.* 2017;46(3):320-30.
49. Network NCC. NCCN Head and Neck Cancer Series: Oral cancer. In: NCCN, editor. 1.2018 ed2018.
50. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
51. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
52. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
53. Barthélémy I, Sannajust J-P, Revol P, Mondie JM. Cancers de la cavité buccale. Préambule, épidémiologie, étude clinique. *Emc - Stomatologie.* 2005;1:277-94.
54. Seoane Leston J, Diz Dios P. Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncol.* 2010;46(6):418-22.
55. Wong DT. Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance'. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(3):267-72.
56. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963-8.
57. Willis RAJCR. Further studies on the mode of origin of carcinomas of the skin. 1945;5(8):469-79.
58. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993;53(19):4477-80.
59. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995;332(11):712-7.
60. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727-30.
61. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011;2011:603740.

62. Kingsley K, O'Malley S, Ditmyer M, Chino M. Analysis of oral cancer epidemiology in the US reveals state-specific trends: implications for oral cancer prevention. *BMC Public Health*. 2008;8:87.
63. Latino-Martel P, Druesne-Pecollo N, Dumond A. [Nutritional factors and oral cancers]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011;112(3):155-9.
64. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD, et al. High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(7):1653-61.
65. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer J*. 2015;21(3):138-46.
66. Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*. 2020;122(3):306-14.
67. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*. 2019;11(10).
68. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):781-9.
69. Klusmann JP, Weissenborn S, Fuchs PG. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001;345(5):376; author reply 7.
70. Lescaille G, Descroix V, Azerad J. [Papillomavirus and head and neck cancer]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011;112(3):160-3.
71. Mirghani H, Amen F, Moreau F, Lacau St Guily J. Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? *Oral Oncol*. 2015;51(3):229-36.
72. Schache AG, Powell NG, Cuschieri KS, Robinson M, Leary S, Mehanna H, et al. HPV-Related Oropharynx Cancer in the United Kingdom: An Evolution in the Understanding of Disease Etiology. *Cancer Res*. 2016;76(22):6598-606.
73. Ligier K, Belot A, Launoy G, Velten M, Delafosse P, Guizard AV, et al. [Epidemiology of oral cavity cancers in France]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011;112(3):164-71.
74. Irani S. Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis. *Iran J Pathol*. 2016;11(4):303-22.
75. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-80.
76. Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *J Calif Dent Assoc*. 2009;37(11):789-98.
77. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;46(4):518-39.
78. Agbor MA, Azodo CC, Tefouet TS. Smokeless tobacco use, tooth loss and oral health issues among adults in Cameroon. *Afr Health Sci*. 2013;13(3):785-90.
79. Carrard VC, van der Waal I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23(1):e59-e64.

80. van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(6):e685-92.
81. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(4):195-215.
82. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975;36(4):1386-92.
83. Kramer IR, El-Labban N, Lee KW. The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. *Br Dent J*. 1978;144(6):171-80.
84. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):317-23.
85. Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis*. 2001;7(1):18-24.
86. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg*. 1977;5(1):69-75.
87. Pindborg JJ, Renstrup G, Poulsen HE, Silverman S, Jr. Studies in Oral Leukoplakias. V. Clinical and Histologic Signs of Malignancy. *Acta Odontol Scand*. 1963;21:407-14.
88. Shafer WG, Waldron CA. A clinical and histopathologic study of oral leukoplakia. *Surg Gynecol Obstet*. 1961;112:411-20.
89. Bouquot JE, Whitaker SB. Oral leukoplakia--rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases". *Quintessence Int*. 1994;25(2):133-40.
90. Akrish S, Eskander-Hashoul L, Rachmiel A, Ben-Izhak O. Clinicopathologic analysis of verrucous hyperplasia, verrucous carcinoma and squamous cell carcinoma as part of the clinicopathologic spectrum of oral proliferative verrucous leukoplakia: A literature review and analysis. *Pathol Res Pract*. 2019;215(12):152670.
91. Staines K, Rogers H. Oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia: a review for dental practitioners. *Br Dent J*. 2017;223(9):655-61.
92. Capella DL, Goncalves JM, Abrantes AAA, Grando LJ, Daniel FI. Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2017;83(5):585-93.
93. Lombardi T, Kuffer R. [Dynamic concept of oral lichen planus. The diagnosis easy at early stages may become difficult in ancient lichen planus]. *Presse Med*. 2016;45(2):227-39.
94. Holmstrup P. The controversy of a premalignant potential of oral lichen planus is over. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(6):704-6.
95. Larsson A, Warfvinge G. Malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Oncol*. 2003;39(6):630-1.
96. Seintou A, Gaydarov N, Lombardi T, Samson J. Histoire naturelle et transformation maligne du lichen plan buccal. 2ème partie: présentation de 6 cas. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*. 2012;18(3):235-50.
97. Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(3):308-15.

98. Muller S. Oral manifestations of dermatologic disease: a focus on lichenoid lesions. *Head Neck Pathol.* 2011;5(1):36-40.
99. Hiremath SK, Kale AD, Charantimath S. Oral lichenoid lesions: clinico-pathological mimicry and its diagnostic implications. *Indian J Dent Res.* 2011;22(6):827-34.
100. Gupta U, Barman KD, Saify K. Squamous cell carcinoma complicating an untreated chronic discoid lupus erythematosus (CDLE) lesion in a black female. *J Dermatol.* 2005;32(12):1010-3.
101. Aviles Izquierdo JA, Cano Martinez N, Lazaro Ochaita P. Epidemiological characteristics of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(1):69-73.
102. Schiodt M, Andersen L, Shear M, Smith CJ. Leukoplakia-like lesions developing in patients with oral discoid lupus erythematosus. *Acta Odontol Scand.* 1981;39(4):209-16.
103. Neville BW, Damm DD, Allen C, Chi AC. *Oral and maxillofacial pathology: Elsevier Health Sciences;* 2015.
104. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dent Clin North Am.* 2020;64(1):25-37.
105. Holmstrup P. Oral erythroplakia-What is it? *Oral Dis.* 2018;24(1-2):138-43.
106. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol.* 2005;41(6):551-61.
107. Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P. A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *Int J Cancer.* 1999;80(3):345-8.
108. Summerlin DJ. Precancerous and cancerous lesions of the oral cavity. *Dermatol Clin.* 1996;14(2):205-23.
109. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer.* 1975;36(3):1021-8.
110. Wang YP, Chen HM, Kuo RC, Yu CH, Sun A, Liu BY, et al. Oral verrucous hyperplasia: histologic classification, prognosis, and clinical implications. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(8):651-6.
111. Hazarey VK, Ganvir SM, Bodhade AS. Verrucous hyperplasia: A clinico-pathological study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011;15(2):187-91.
112. Hsue SS, Wang WC, Chen CH, Lin CC, Chen YK, Lin LM. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(1):25-9.
113. Shear M, Pindborg JJ. Verrucous hyperplasia of the oral mucosa. *Cancer.* 1980;46(8):1855-62.
114. Woolgar JA, Triantafyllou A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical pathology. *Periodontol 2000.* 2011;57(1):51-72.
115. Rigel DS, Stein Gold LF. The importance of early diagnosis and treatment of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(1 Suppl 1):S20-7.
116. Rossi R, Mori M, Lotti T. Actinic keratosis. *Int J Dermatol.* 2007;46(9):895-904.
117. Gutzmer R, Wiegand S, Kolbl O, Wermker K, Heppt M, Berking C. Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(37):616-26.

118. Lalji A, Khuroy N, Lalji M. Actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Clin Res Dermatol Open*. 2014;1(1):1-3.
119. Bagan JV, Jimenez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortes J, Sanchis-Bielsa JM, Poveda-Roda R, et al. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. *Oral Oncol*. 2011;47(8):732-5.
120. Zide MF. Actinic keratosis: from the skin to the lip. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(6):1162-76.
121. Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol*. 1999;25(5):520-3.
122. Reich M, Licitra L, Vermorken JB, Bernier J, Parmar S, Golusinski W, et al. Best practice guidelines in the psychosocial management of HPV-related head and neck cancer: recommendations from the European Head and Neck Cancer Society's Make Sense Campaign. *Ann Oncol*. 2016;27(10):1848-54.
123. McGurk M, Chan C, Jones J, O'Regan E, Sherriff M. Delay in diagnosis and its effect on outcome in head and neck cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2005;43(4):281-4.
124. Hanna TP, King WD, Thibodeau S, Jalink M, Paulin GA, Harvey-Jones E, et al. Mortality due to cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020;371:m4087.
125. Blatt S, Ziebart T, Kruger M, Pabst AM. Diagnosing oral squamous cell carcinoma: How much imaging do we really need? A review of the current literature. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(5):538-49.
126. Dvoryaninova OY, Chainzonov EL, Litvyakov NV. [The clinical aspects of HPV-positive cancer of the oral cavity and oropharynx]. *Vestn Otorinolaringol*. 2016;81(1):72-7.
127. Adeyemi BF, Kolude B. Clinical presentation of oral squamous cell carcinoma. *Niger Postgrad Med J*. 2013;20(2):108-10.
128. Arn Migowski Rocha dos Santos CMR, Marcell de Oliveira Santos, Maria Asuncion Sole Pla, Maria Beatriz Kneipp Dias, Maria Eduarda Leão Diogenes Melo, Mario Jorge Sobreira da Silva, Marise Souto Rebelo, Mônica de Assis, Telma de Almeida Souza, Ubirani Barros Otero. ABC do Câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer (INCA). 6° ed. Rio de Janeiro : INCA2020. 112 p.
129. Clínica CR-O, Oncológica LAMJ-C, Epidemiologia LCST-, Câncer MR-Rd, Radioterapia MG-. TNM / Classificação de Tumores Malignos. 6ª ed. L. H. Sobin MD, Pathology DoG, Pathology AFlo, Washington DC, USA, editors. Rio de Janeiro2004. 254 p.
130. Lin NC, Hsien SI, Hsu JT, Chen MYC. Impact on patients with oral squamous cell carcinoma in different anatomical subsites: a single-center study in Taiwan. *Sci Rep*. 2021;11(1):15446.
131. Mroueh R, Haapaniemi A, Saarto T, Gronholm L, Grenman R, Salo T, et al. Non-curative treatment of patients with oral tongue squamous-cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276(7):2039-45.
132. Panarese I, Aquino G, Ronchi A, Longo F, Montella M, Cozzolino I, et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019;19(2):105-19.

133. Varsha BK, Radhika MB, Makarla S, Kuriakose MA, Kiran GS, Padmalatha GV. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Case series and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2015;19(3):335-41.
134. Cheng MF, Huang MS, Lin CS, Lin LH, Lee HS, Jiang JC, et al. Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2014;65(1):24-34.
135. Gueiros LA, Coletta RD, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(5):510-5.
136. Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2007;8(3):227-38.
137. Zender CA, Petruzzelli GJ. Why do patients with head and neck squamous cell carcinoma experience distant metastases: can they be prevented? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;13(2):101-4.
138. Crowder SL, Li Z, Sarma KP, Arthur AE. Chronic Nutrition Impact Symptoms Are Associated with Decreased Functional Status, Quality of Life, and Diet Quality in a Pilot Study of Long-Term Post-Radiation Head and Neck Cancer Survivors. *Nutrients.* 2021;13(8).
139. Rosenthal DI, Mendoza TR, Chambers MS, Burkett VS, Garden AS, Hessel AC, et al. The M. D. Anderson symptom inventory-head and neck module, a patient-reported outcome instrument, accurately predicts the severity of radiation-induced mucositis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;72(5):1355-61.
140. Pateman KA, Ford PJ, Batstone MD, Farah CS. Coping with an altered mouth and perceived supportive care needs following head and neck cancer treatment. *Support Care Cancer.* 2015;23(8):2365-73.
141. Kabir TD, Leigh RJ, Tasena H, Mellone M, Coletta RD, Parkinson EK, et al. A miR-335/COX-2/PTEN axis regulates the secretory phenotype of senescent cancer-associated fibroblasts. *Aging (Albany NY).* 2016;8(8):1608-35.
142. Sobral LM, Zecchin KG, Nascimento de Aquino S, Lopes MA, Graner E, Coletta RD. Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2011;25(4):1013-20.
143. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol.* 2008;44(5):509-17.
144. Hinsley EE, de Oliveira CE, Hunt S, Coletta RD, Lambert DW. Angiotensin 1-7 inhibits angiotensin II-stimulated head and neck cancer progression. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(4):247-57.
145. Gurley SB, Riquier-Brison ADM, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, et al. AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab.* 2011;13(4):469-75.
146. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel

members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507-20.

147. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999;12(12 Pt 3):205S-13S.

148. Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT, Duncia JV, Price WA, Jr., Wells GJ, et al. Angiotensin II receptor antagonists. From discovery to antihypertensive drugs. *Hypertension*. 1991;18(5 Suppl):III136-42.

149. David Pearce VBeJWF. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors: Renal and Extrarenal Roles / Brenner and Rector's *The Kidney*. 10 ed: Copyright © 2020 da Elsevier; 2020.

150. Smollock E, Berk BC. Chapter 98 - Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling in Atherosclerosis and Restenosis. In: Hill JA, Olson EN, editors. *Muscle*. Boston/Waltham: Academic Press; 2012. p. 1301-9.

151. Long CA, Kwolek CJ, Watkins MT. Chapter 61 - Vascular Trauma. In: Creager MA, Beckman JA, Loscalzo J, editors. *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013. p. 739-54.

152. Rajani C, Borisa P, Karanwad T, Borade Y, Patel V, Rajpoot K, et al. 7 - Cancer-targeted chemotherapy: Emerging role of the folate anchored dendrimer as drug delivery nanocarrier. In: Chauhan A, Kulhari H, editors. *Pharmaceutical Applications of Dendrimers*: Elsevier; 2020. p. 151-98.

153. Crowley SD, Rudemiller NP. Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1350-61.

154. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Ryan R, Pucci F, Sio SW, et al. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity*. 2013;38(2):296-308.

155. Shen XZ, Billet S, Lin C, Okwan-Duodu D, Chen X, Lukacher AE, et al. The carboxypeptidase ACE shapes the MHC class I peptide repertoire. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1078-85.

156. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):745-59.

157. Coulson R, Liew SH, Connelly AA, Yee NS, Deb S, Kumar B, et al. The angiotensin receptor blocker, Losartan, inhibits mammary tumor development and progression to invasive carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(12):18640-56.

158. Incio J, Liu H, Suboj P, Chin SM, Chen IX, Pinter M, et al. Obesity-Induced Inflammation and Desmoplasia Promote Pancreatic Cancer Progression and Resistance to Chemotherapy. *Cancer Discov*. 2016;6(8):852-69.

159. Okazaki M, Fushida S, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, et al. The angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan suppresses proliferation and fibrosis in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014;355(1):46-53.

160. Masamune A, Hamada S, Kikuta K, Takikawa T, Miura S, Nakano E, et al. The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48(5):602-9.

161. Tahmasebi M, Barker S, Puddefoot JR, Vinson GP. Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. *Br J Cancer*. 2006;95(1):67-74.
162. Epelman S, Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(9):750-4.
163. Zhang Q, Yu S, Lam MMT, Poon TCW, Sun L, Jiao Y, et al. Angiotensin II promotes ovarian cancer spheroid formation and metastasis by upregulation of lipid desaturation and suppression of endoplasmic reticulum stress. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):116.
164. Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun*. 2013;4:2516.
165. Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2909-14.
166. Neo JH, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(4):577-84.
167. Kosaka T, Miyajima A, Takayama E, Kikuchi E, Nakashima J, Ohigashi T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(1):41-9.
168. Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, et al. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res*. 2005;11(7):2686-94.
169. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995;47(1):25-49.
170. Zhao Y, Xu C. [Structure and function of angiotensin converting enzyme and its inhibitors]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2008;24(2):171-6.
171. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(4):177-83.
172. Rivière G. L'enzyme de conversion de l'angiotensine: une protéase conservée au cours de l'évolution. *Journal de la Société de Biologie*. 2009;203(4):281-93.
173. Studdy PR, Lapworth R, Bird R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. *J Clin Pathol*. 1983;36(8):938-47.
174. Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(3):256-65.
175. Lopez-Sublet M, Caratti di Lanzacco L, Danser AHJ, Lambert M, Elourimi G, Persu A. Focus on increased serum angiotensin-converting

enzyme level: From granulomatous diseases to genetic mutations. *Clin Biochem*. 2018;59:1-8.

176. Pietinalho A, Furuya K, Yamaguchi E, Kawakami Y, Selroos O. The angiotensin-converting enzyme DD gene is associated with poor prognosis in Finnish sarcoidosis patients. *Eur Respir J*. 1999;13(4):723-6.

177. Schurmann M. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in patients with pulmonary sarcoidosis: impact on disease severity. *Am J Pharmacogenomics*. 2003;3(4):233-43.

178. Nash DT. Comparative properties of angiotensin-converting enzyme inhibitors: relations with inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme and potential clinical implications. *Am J Cardiol*. 1992;69(10):26C-32C.

179. Vinson GP, Barker S, Puddefoot JR. The renin-angiotensin system in the breast and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(1):R1-19.

180. Bradshaw AR, Wickremesekera AC, Brasch HD, Chibnall AM, Davis PF, Tan ST, et al. Glioblastoma Multiforme Cancer Stem Cells Express Components of the Renin-Angiotensin System. *Front Surg*. 2016;3:51.

181. Guerra FK, Ciuffo GM, Elizalde PV, Charreau EH, Saavedra JM. Enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin converting enzyme in medroxyprogesterone-induced mouse mammary adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193(1):93-9.

182. Wen SW, Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin angiotensin system regulates Kupffer cells in colorectal liver metastases. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(8):720-7.

183. Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer*. 2010;10:134.

184. Louis SN, Wang L, Chow L, Rezmann LA, Imamura K, MacGregor DP, et al. Appearance of angiotensin II expression in non-basal epithelial cells is an early feature of malignant change in human prostate. *Cancer Detect Prev*. 2007;31(5):391-5.

185. Sitzmann JV, Wu Y, Cameron JL. Altered angiotensin-II receptors in human hepatocellular and hepatic metastatic colon cancers. *Ann Surg*. 1994;219(5):500-6; discussion 6-7.

186. De Paepe B, Verstraeten VM, De Potter CR, Bullock GR. Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(1):13-9.

187. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, et al. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021;23(4):682-96.

188. Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med*. 1975;82(1):96-100.

189. Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF. Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci*. 2008;53(5):1206-10.

190. Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, et al. Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular

permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):245-55.

191. Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, et al. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(10):567-73.

192. Wysocki PJ, Kwiatkowska EP, Kazmierczak U, Suchorska W, Kowalczyk DW, Mackiewicz A. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):4095-102.

193. Ishizaka N, Matsuzaki G, Saito K, Noiri E, Mori I, Nagai R. Expression and localization of PDGF-B, PDGF-D, and PDGF receptor in the kidney of angiotensin II-infused rat. *Lab Invest*. 2006;86(12):1285-92.

194. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells*. 2005;20(2):263-70.

195. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1401(2):187-94.

196. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991;68(2):450-6.

197. Buharalioglu CK, Song CY, Yaghini FA, Ghafoor HU, Motiwala M, Adris T, et al. Angiotensin II-induced process of angiogenesis is mediated by spleen tyrosine kinase via VEGF receptor-1 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):H1043-55.

198. Li SH, Lu HI, Chang AY, Huang WT, Lin WC, Lee CC, et al. Angiotensin II type I receptor (AT1R) is an independent prognosticator of esophageal squamous cell carcinoma and promotes cells proliferation via mTOR activation. *Oncotarget*. 2016;7(41):67150-65.

199. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest*. 2003;112(1):67-75.

200. Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, et al. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest*. 1996;98(3):671-9.

201. Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N, Benessiano J, Duriez M, deGasparo M, et al. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension*. 2002;39(3):830-5.

202. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72.

203. Nogueira EF, Vargas CA, Otis M, Gallo-Payet N, Bollag WB, Rainey WE. Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol*. 2007;39(6):365-74.

204. Bell L, Luthringer DJ, Madri JA, Warren SL. Autocrine angiotensin system regulation of bovine aortic endothelial cell migration and

plasminogen activator involves modulation of proto-oncogene pp60c-src expression. *J Clin Invest.* 1992;89(1):315-20.

205. Kawahara Y, Sunako M, Tsuda T, Fukuzaki H, Fukumoto Y, Takai Y. Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;150(1):52-9.

206. Kobayashi K, Imanishi T, Akasaka T. Endothelial progenitor cell differentiation and senescence in an angiotensin II-infusion rat model. *Hypertens Res.* 2006;29(6):449-55.

207. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science.* 2006;313(5794):1785-7.

208. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension.* 2000;35(5):1069-73.

209. Benndorf R, Boger RH, Ergun S, Steenpass A, Wieland T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res.* 2003;93(5):438-47.

210. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(4):R994-R1000.

211. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci.* 2000;66(1):67-76.

212. Miura S, Karnik SS. Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J.* 2000;19(15):4026-35.

213. Soubrier F, Hubert C, Testut P, Nadaud S, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens.* 1993;11(5):471-6.

214. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation.* 1998;97(14):1411-20.

215. Lezama-Martinez D, Flores-Monroy J, Fonseca-Coronado S, Hernandez-Campos ME, Valencia-Hernandez I, Martinez-Aguilar L. Combined Antihypertensive Therapies That Increase Expression of Cardioprotective Biomarkers Associated With the Renin-Angiotensin and Kallikrein-Kinin Systems. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018;72(6):291-5.

216. Marte F, Sankar P, Cassagnol M. Captopril. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2022.

217. Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertension: To Use or Not to Use? *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(13):1474-82.

218. Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6(7):835-44.

219. Escobar E, Rodriguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J. Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2(4):385-99.

220. Zhao Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Wu J. Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of

- phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(4):304-10.
221. Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res*. 2004;94(6):785-93.
222. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2007;59(2):185-205.
223. Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):271-9.
224. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):881-900.
225. Hii SI, Nicol DL, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1998;77(6):880-3.
226. Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 2001;7(4):1073-8.
227. Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T. Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta Oncol*. 2004;43(2):142-52.
228. Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(9):1042-50.
229. de Groot-Besseling RR, Ruers TJ, van Kraats AA, Poelen GJ, Ruiter DJ, de Waal RM, et al. Anti-tumor activity of a combination of plasminogen activator and captopril in a human melanoma xenograft model. *Int J Cancer*. 2004;112(2):329-34.
230. Pinheiro L, Perdomo-Pantoja A, Casaos J, Huq S, Paldor I, Vigilar V, et al. Captopril inhibits Matrix Metalloproteinase-2 and extends survival as a temozolomide adjuvant in an intracranial gliosarcoma model. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021;207:106771.
231. Kast RE, Halatsch ME. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in glioblastoma: a trio of old drugs-captopril, disulfiram and nelfinavir-are inhibitors with potential as adjunctive treatments in glioblastoma. *Arch Med Res*. 2012;43(3):243-7.
232. Yamamoto D, Takai S, Miyazaki M. Inhibitory profiles of captopril on matrix metalloproteinase-9 activity. *Eur J Pharmacol*. 2008;588(2-3):277-9.
233. Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Tsujinoue H, et al. Suppression of the renin-angiotensin system attenuates vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2002;20(6):1227-31.

234. Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D. Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;81(5):761-6.
235. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet*. 1998;352(9123):179-84.
236. Ronquist G, Rodriguez LA, Ruigomez A, Johansson S, Wallander MA, Frithz G, et al. Association between captopril, other antihypertensive drugs and risk of prostate cancer. *Prostate*. 2004;58(1):50-6.
237. Lang L. ACE inhibitors may reduce esophageal cancer incidence. *Gastroenterology*. 2006;131(2):343-4.
238. Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, Paridon SM, Chin AJ, Rychik J, et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):820-8.
239. Ebert MP, Lendeckel U, Westphal S, Dierkes J, Glas J, Folwaczny C, et al. The angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is linked to early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(12):2987-9.
240. Rocken C, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, et al. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin Cancer Res*. 2005;11(7):2526-30.
241. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Lobo F, Morais A, et al. Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *J Pathol*. 2004;202(3):330-5.
242. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int*. 2005;68(5):2189-96.
243. Abuohashish HM, Ahmed MM, Sabry D, Khattab MM, Al-Rejaie SS. ACE-2/Ang1-7/Mas cascade mediates ACE inhibitor, captopril, protective effects in estrogen-deficient osteoporotic rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:58-68.
244. Xiao HL, Li CS, Zhao LX, Yang J, Tong N, An L, et al. Captopril improves postresuscitation hemodynamics protective against pulmonary embolism by activating the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016;389(11):1159-69.
245. Li Y, Zeng Z, Li Y, Huang W, Zhou M, Zhang X, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury by regulating the balance between angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 and inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. *Shock*. 2015;43(4):395-404.
246. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(4):R804-17.

247. Hunley TE, Tamura M, Stoneking BJ, Nishimura H, Ichiki T, Inagami T, et al. The angiotensin type II receptor tonically inhibits angiotensin-converting enzyme in AT2 null mutant mice. *Kidney Int.* 2000;57(2):570-7.

7 ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL



PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 07 de julho de 2017.

Processo N.º 140

Título do Projeto: ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM DOENÇAS BUCAIS

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Histórico

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais frequente da região de cabeça e pescoço, representa um dos principais problemas de saúde pública não só no Brasil, mas também em muitos países do mundo devido a sua alta mortalidade e constante mutilação. Evidências demonstraram que diversas alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas estão associadas à patogênese do CCEB. De acordo com a American Cancer Society são esperados cerca de 45.000 novos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) a ser diagnosticados até o fim de 2015. Apesar do enorme avanço na quimioterapia, radioterapia e procedimentos cirúrgicos, a taxa de sobrevivência pouco mudou nos últimos 30 anos em muitos países. Mais significativamente, para a maioria dos pacientes com CECP, a doença é altamente maligna, com um prognóstico ruim e baixa taxa de sobrevivência. Esta alta taxa de morbidade é devido não só à recorrência da neoplasia local, mas também, devido à metástase para outros órgãos vitais. Abordagens terapêuticas atuais para doenças complexas são limitada pela falta de caracterização molecular das vias essenciais na iniciação, progressão e cronicidade da doença. Estudos recentes demonstraram que o Captopril (D-3-mercaptopropanoilo-L-prolina), um inibidor oralmente ativo da enzima conversora de angiotensina (ACE) que converte a angiotensina I em angiotensina II, é amplamente utilizada no tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca. Além de sua capacidade de reduzir a pressão arterial, captopril tem também várias outras atividades biológicas. Pode melhorar a artrite, retinopatia diabética reversa, aumentar a sensibilidade à insulina, diminuir o risco trombótico, diminuir a aterosclerose ea insuficiência renal. Além disso, os inibidores da ECA são acreditados para diminuir o risco de cancro devido a redução de atividade da angiotensina II, que em estudos experimentais foi mostrado que estimula a neoangiogênese, aumentando a produção do fator de crescimento endotelial vascular, potenciar os efeitos mitogênicos de fator de crescimento epidérmico e induzem oncogenes celulares c-myc, c-fos, cN-ras e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β .

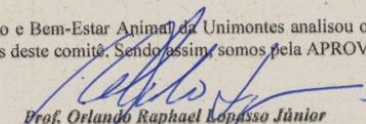
Mérito

Avaliar Alterações Metabólicas em Doenças Bucais com os Objetivos Específicos:

- a. Analisar o efeito do captopril sobre a proliferação, migração e invasão em linhagens de células neoplásicas de CCEB.
- b. Verificar a influência do captopril e do estresse sobre a expressão dos genes KI67, BAX, BCL2, P53, em células neoplásicas de CCEB.
- c. Verificar a influência do captopril sobre a expressão do gene MMP2, TIMP (1-2-3), em células neoplásicas de CCEB.
- d. 4 Avaliar uma possível correlação entre a expressão dos genes KI67, BAX, BCL2, P53 com os parâmetros fenotípicos, proliferação, migração e invasão em linhagens células neoplásicas de CCEB tratadas com captopril.
- e. Analisar, in vivo, o efeito do captopril sobre parâmetros clínicos tumorais (tamanho, metástase local e metástase a distância) na carcinogênese de boca quimicamente induzida.
- f. Analisar, in vivo, o efeito do estresse sobre parâmetros clínicos tumorais (tamanho, metástase local e metástase a distância) com carcinogênese de boca quimicamente induzida.
- g. Analisar e quantificar a evolução da lesão periapical, e sua perda óssea, em seus aspectos radiográficos e histológicos, em camundongos condicionados ao estresse.
- h. Avaliar, e elucidar as questões relacionadas no presente trabalho no desenvolvimento da lesão periapical e sua perda óssea em camundongos expostos ao estresse.
- i. Induzir obesidade e suas características metabólicas através do consumo de dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem Swiss com carcinogênese de boca quimicamente induzida.
- j. Avaliar a evolução no ganho de peso corporal e ingestão calórica dos animais durante o período experimental.
- k. Analisar a resistência à insulina da glicose plasmática em jejum, níveis de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, teste de tolerância de glicose e sensibilidade a insulina. Baseada nas Informações contidas no projeto e no Protocolo para uso de animais em Pesquisa o Projeto tem Mérito.

Parecer

A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes analisou o processo 140 e entende que o mesmo encontra-se completo e dentro das normas deste comitê. Sendo assim, somos pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa


Prof. Orlando Raphael Kopaszo Júnior
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação
e Bem-Estar Animal da UNIMONTES