



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

ABIGAIL NAYARA DOS SANTOS SILVA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE *TWIST1* EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO NO ESTADO DO PARÁ.

BELÉM

2017

ABIGAIL NAYARA DOS SANTOS SILVA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE *TWIST1* EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO NO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Co-orientadora: Msc. Michelle Carvalho de Abreu

BELÉM

2017

ABIGAIL NAYARA DOS SANTOS SILVA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE *TWIST1* EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL DE PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO NO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina, aprovado com o conceito

Belém (PA), 10 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr. André Salim Khayat (ICB – UFPA)

Dr^a. Adriana Costa Guimarães (ICB – UFPA)

Dr^a. Carolina Rosal (ICB – UFPA)

Dr^a. Luciana Quintana (ICB – UFPA)

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Berenice, que é e sempre será a principal responsável por todas as realizações da minha vida. Pelo amor incondicional, dedicação, zelo, honestidade e educação. Por apoiar todas as minhas decisões e sonhar ao meu lado cada sonho, tornando-os possíveis a mim. Obrigada por me ensinar a não desistir, por me fazer acreditar que sempre será possível alcançar e realizar os meus objetivos, por sempre ter feito o impossível para ver minha felicidade, por ter estado ao meu lado a cada momento, principalmente nos mais difíceis. És meu maior exemplo de garra e de amor, minha heroína, todo e qualquer agradecimento feito à senhora jamais se igualaria a tudo que você me ofereceu. Só peço à Deus que te proteja sempre, te guarde e nos permita viver muito mais histórias de amor e companheirismo juntas. Te amo demais!

À minha vó, Abigail, que sempre me deu muito amor e incentivo e junto à minha mãe me deu todo suporte, educação e amor que precisei para minha formação. Sempre orou por mim e pelos meus sonhos pedindo à Deus minha proteção. Pelas conversas, confidências e sua sabedoria inigualável, apoiado e aconselhado sobre todas minhas decisões. Pelo colo tão gostoso e aconchegante sempre que precisei e por ter feito eu me sentir mais próximo de Deus em cada conversa nossa. Todo e qualquer agradecimento feito à ti não seria suficiente. Te amo, vizinha!

AGRADECIMENTOS

À DEUS, POR TUDO. Por ter sido meu porto seguro, me proteger, dar-me forças, guiar e acompanhar em todos os momentos da minha vida. Por ter me permitido realizar mais este sonho, muito obrigada, meu senhor!

Aos meus familiares, por todo apoio, incentivo, orações e ajuda. Obrigada por acreditarem em mim e por cada palavra de carinho e incentivo, por contribuírem de forma direta ou indireta na minha caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Salim Khayat, pela orientação, convívio e pelo aprendizado imensurável. Por ter me dado a chance de ser parte do seu grupo de alunos. O senhor é um grande exemplo de profissional, no qual desde o primeiro dia de aula na graduação tive o desejo de me espelhar, e com a convivência diária no laboratório pude ver de perto que além de um exímio profissional é também exemplo de paciência, simplicidade, amizade, dedicação e inteligência, digno de ser chamado mestre!

À todos os professores da Universidade Federal do Pará. Os conhecimentos transmitidos por vocês foram de extrema valia não só para a execução deste estudo, mas para a minha formação acadêmica e profissional.

À companheira de trabalho, Michelle Abreu, por toda amizade, auxílio e os ensinamentos prestado durante a execução desse trabalho. Pelo apoio, incentivo e conversas que com certeza foram fundamentais ao meu aprendizado. Por ter me acompanhado em todos os momentos desse árduo, porém gratificante trabalho.

À querida Aline Seabra, por ter me ensinado os primeiros passos das técnicas laboratoriais da biologia molecular, pelo carinho e paciência imensurável com que sempre me tratou, pela pessoa maravilhosa que é e que tive a honra de conviver e tê-la como amiga. Você é um exemplo para mim, Line, obrigada por tudo!

À Luciana Quintana, pelos ensinamentos, amizade e por todo seu incentivo e carinho, obrigada por sempre ter disponibilidade a me ensinar os passos da técnica da cultura celular, pelos momentos de descontração, por sempre arrancar risos e pela convivência com a pessoa admirável que és. Obrigada, Lu!

Ao Antônio Conde, sempre brincalhão e solícito a todo instante. Agradeço por sempre estar disponível em ajudar na execução das técnicas. Obrigada, Tonico!

À Taíssa Araújo, pelas conversas, incentivo durante esta caminhada, pela disponibilidade diária em ajudar e pelo carinho com que sempre me tratou. Pelas

oportunidades de trabalhos em congressos que me ajudou a realizar. Muito obrigada, Tatá!

À Flávia, Adrhyann, Marcelli e Amanda, minhas eternas amigas “ICs” com quem compartilhei risos, sonhos e frustrações do período da graduação, pelo convívio, incentivo e amizade durante esses anos. Obrigada meninas!

A todos os meus queridos colegas de laboratório, com quem passamos a maior parte do tempo e dividimos nossas experiências, sucessos e dissabores, cujos nomes não listarei para não correr o risco de esquecer alguém, afinal todos, sem exceção, são exemplares a mim e contribuíram de alguma forma durante essa jornada.

À turma de biomedicina 2013, onde fiz amigos e colegas que sempre levarei em meu coração com muito carinho e que contribuíram de alguma forma durante este período de caminhada. Em especial ao Ismael, Letícia e Vanessa, amigos muito queridos, com os quais pude dividir nestes quatro anos momentos inesquecíveis e formidáveis! Pelas conversas, momentos de apoio mútuo e incentivo. Dividimos alegrias, tristezas, desesperos, madrugadas sem dormir, corujões, aprendizados, muitas gargalhadas e um companheirismo lindo. Vocês foram um grande presente!

A todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando, incentivando e acreditando em mim. Por terem entendido minha ausência em muitas situações e até mesmo a distância física, porém nossos corações sempre unidos. Obrigada por, de alguma forma, contribuírem para a realização deste sonho.

Ao Arthur Gonçalves, pelo apoio, companhia, carinho, cumplicidade, amor, amizade e principalmente a paciência diária, por sempre me incentivar em todos os momentos, sendo eles fáceis ou difíceis, comemorando cada conquista ao meu lado.

Aos pacientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto, que humildemente possibilitaram a realização deste trabalho.

Às residentes da Patologia Bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto por serem sempre solícitos e atenciosos.

A todos, meu MUITO OBRIGADA!

SÚMARIO	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	X
RESUMO	XII
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	12
1.1.1 Considerações Gerais	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CEO	14
1.3 FATORES ETIOLÓGICOS	15
1.3.1 Tabagismo	15
1.3.2 Etilismo	16
1.3.3 HPV	19
1.4 CARCINOGENESE	20
1.4.1 Transição Epitelial-Mesenquimal e Metástase	23
1.4.2 O gene <i>TWIST1</i>	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	34
3.2 AMOSTRAS	34
3.3 PCR TEMPO REAL	35
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH: enzima álcool-desidrogenase

AKT: serine/threonine kinase 1

ALDH: enzima aldeído-desidrogenase

CEO: Carcinoma epidermoide oral

c-MYC: avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

EBV: Epstein-Barr vírus

EGFR: Epidermal growth factor receptor

FGF: Fibroblast Grow Factor

FGFR2: fibroblast growth factor receptor 2

HPV: Papilomavírus Humano

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

mTOR: mechanistic target of rapamycin

NNK: cetona de nitrosamina derivada de nicotina

NNN: N-nitrosornicotina

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

q-PCR: Quantificação de expressão por RT-PCR

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa

RUNX2: runt related transcription factor 2

SCS: síndrome Saethre-Chotzen

TEM: transição epitelial-mesenquimal

TNM: Classificação de Tumores Malignos (do Inglês Tumour, Node and Metastasis)

TSNA: nitrosaminas específicas do tabaco

TWIST1: Gene *TWIST* (Twist family bHLH transcription factor 1)

ZEB1: zinc finger E-box binding homeobox 1

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

	Pág.
FIGURA 1: Mecanismo de promoção cancerígena, a partir da formação de adutos de DNA.....	16
FIGURA 2: Metabolismo do etanol e seu papel na carcinogênese.....	18
FIGURA 3: Transição epitelial-mesenquimal.....	23
FIGURA 4: Diferentes tipos de TEM.....	25
FIGURA 5: Regulação negativa de E-caderina pela β -catenina.....	27
FIGURA 6: Mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvida durante o processo de iniciação de TEM.....	29
FIGURA 7: Localização do gene <i>TWIST1</i> no cromossomo 7(p21. 2).....	30
FIGURA 8: Reação de q-PCR com o gene alvo <i>TWIST1</i> e <i>GAPDH</i>	37
TABELA 1: frequência absoluta e percentual dos dados clínico-patológicos dos 35 pacientes estudados	35
GRÁFICO 1: Relação da expressão de <i>TWIST1</i> nos tecidos estudados.....	38

RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço é um dos dez tipos mais comuns de câncer em todo o mundo, com variações epidemiológicas entre diferentes regiões geográficas, caracterizando-se por mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência. O Carcinoma epidermoide oral (CEO) representa a entidade clínica mais comum responsável por mais de 90% de todas as malignidades orais e caracteriza-se como uma neoplasia agressiva proveniente do tecido epitelial de revestimento, o qual apresenta-se em maior número em pacientes do gênero masculino após a quinta década de vida, e sua causa está relacionada a fatores extrínsecos, à exemplo dos agentes carcinogênicos como o tabaco, álcool e a exposição ao papilomavírus humano e, em menor frequência, a má higienização da cavidade oral. Dentre os sítios anatômicos acometidos, os mais incidentes e que também apresentam um pior índice quanto ao prognóstico, são a borda lateral posterior da língua e soalho bucal. O gene *TWIST1* vem sendo relacionado a diversos tipos de carcinomas, inclusive o epidermoide oral e sua superexpressão está ligada aos processos de transição epitelial-mesenquimal, invasividade e metástase. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do gene *TWIST1* em espécimes de CEO de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde do Estado do Pará, identificar se há relação entre o estadiamento dos tumores e a alteração da expressão neste gene, assim como, correlacionar os resultados encontrados nestas análises e avaliar a existência de associação dos mesmos, com as demais características clínico-patológicas dos tumores estudados. A expressão de gene *TWIST1* foi avaliada em triplicata pela técnica q-PCR e pelo teste estatístico Bioestat[®] versão 5.3. Os resultados encontrados foram significativos e demonstraram a expressão do gene *TWIST1* vinte e cinco vezes maior em pacientes portadores de CEO quando comparado aos pacientes sadios. Não foi encontrada significância estatística entre a superexpressão do gene *TWIST1* e os dados clínico-patológicos dos pacientes. Na correlação dos aspectos clínico-patológicos entre si, houve significância entre o desenvolvimento de metástase linfonodal e o etilismo, mostrando um risco nove vezes maior ao paciente etilista. Também foi observada uma tendência estatística para o fato de que o etilismo proporciona maior risco de invasão do tecido conjuntivo ou lâmina própria e o tabagismo proporciona maior risco ao desenvolvimento de metástase linfonodal.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermoide oral, *TWIST1*, TEM.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

1.1.1 Considerações Gerais

O câncer é uma condição patológica, em que ocorre divisão e proliferação celular descontroladas que levam ao acúmulo de populações celulares anormais, interferindo na condição fisiológica do organismo. Na maioria dos tecidos, essas populações anormais de células formam massas sólidas chamadas tumores (LÓPEZ-LÁZARO, 2016).

O termo tumor benigno, é comumente usado para aqueles tumores em que as células são bem semelhantes às que o originaram e não possuem a capacidade de migrar para estes sítios e provocar metástases. Já os tumores malignos, são agressivos e se infiltram em outros tecidos caracterizando o processo de metástase (LÓPEZ-LÁZARO, 2016).

O Carcinoma epidermoide oral (CEO) também denominado como carcinoma de células escamosas, carcinoma escamocelular ou carcinoma espinocelular representa a entidade clínica mais comum responsável por mais de 90% de todas as malignidades orais e caracteriza-se como uma neoplasia agressiva proveniente do tecido epitelial de revestimento (AZAD *et al.*, 2016; MORAL e PARAMIO, 2008).

Histologicamente, as células neoplásicas exibem perda de isomorfismo celular com relação núcleo/citoplasma alterada, apresentam núcleos pleomórficos, nucléolos evidentes e cromatina dispersa. Algumas ilhas epiteliais neoplásicas exibem no centro metaplasia escamosa levando a formação de pérolas córneas (AZAD *et al.*, 2016; NEVILLE *et al.*, 2009; MORAL e PARAMIO, 2008; OGBUREKE *et al.*, 2007).

O CEO apresenta-se em maior número em pacientes do gênero masculino após a quinta década de vida, porém o seu aparecimento vem sendo frequente em pacientes mais jovens devido ao uso abusivo de agentes carcinogênicos, a exemplo do tabaco, álcool, exposição ao papilomavírus humano (HPV) e, em menor frequência, má

higienização da cavidade oral (FRARE *et al.*, 2016; RIVERA E VENEGAS, 2014; HO *et al.*, 2007; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000;).

Em seus estágios iniciais, esta neoplasia pode apresentar-se assintomática na maioria dos casos, os quais são precedidos por lesões pré-malignas clinicamente óbvias, como a eritroplasia e leucoplasia com ulcerações persistentes ou margens exofíticas elevadas (MAIA *et al.*, 2016; MARKOPOULOS, 2012).

Dentre os sítios anatômicos acometidos, os mais incidentes e que também apresentam um pior índice quanto ao prognóstico, são a borda lateral posterior da língua e soalho bucal devido à exposição prolongada à agentes carcinogênicos como o tabaco e seus derivados, bem como o etanol presentes na saliva e à deficiente proteção de ceratina destes sítios anatômicos, que favorecem a penetração dos carcinógenos para os tecidos mais profundos (AKRAM *et al.*, 2013; MARKOPOULOS, 2012; BRENER *et al.*, 2007; GARZINO-DEMO *et al.*, 2006; BARNES *et al.*, 2005).

A maioria dos casos de CEO são diagnosticados em fase tardia, nos estádios III ou IV, o que diminui acentuadamente as chances de sobrevivência e leva a uma deterioração significativa na qualidade de vida do paciente. Ainda, na década passada, sua incidência aumentou em 50%, conseqüentemente, muitos dos pacientes afetados morrem em decorrência da rápida disseminação local ou regional da doença. (KRISHNAN *et al.*, 2016; HILLY *et al.*, 2016; RIVERA E VENEGAS, 2014; WANG *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, pode-se observar uma mudança no sítio primário acometido, com um aumento constante do carcinoma de células escamosas orofaríngeas. Esta alteração foi observada em paralelo a uma diminuição do tabagismo e a identificação da exposição ao HPV, principalmente os subtipos 16 e 18 que são de alto risco oncogênico, atuando como fator de risco para o desenvolvimento de CEO (MARUR *et al.*, 2016; GILLISON *et al.*, 2012).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CEO

O câncer de cabeça e pescoço é um dos dez tipos mais comuns de câncer em todo o mundo, com variações epidemiológicas entre diferentes regiões geográficas, caracterizando-se por mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência. Dentre estes, o carcinoma epidermoide é o subtipo mais frequente e apresenta um alto potencial para progressão local, metástase nodal bem como metástases distantes tardias (AZAD *et al.*, 2016; KAWAHARA *et al.*, 2016).

As estimativas mundiais apontam este tipo de câncer com maior incidência em regiões desenvolvidas, porém as taxas de mortalidade encontram-se mais elevadas em países subdesenvolvidos. Também é observado que a incidência de CEO no gênero masculino é cerca de três vezes maior que no gênero feminino (SASAHIRA *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016; KAWAHARA *et al.*, 2016; CONWAY; PETTICREW; MARLBOROUGH, 2008).

No sudeste Asiático é a principal causa de morte por câncer devido ao hábito frequente do tabagismo e mastigação de tabaco e derivados, como castanha de betel, característicos da região. Na Índia é classificado como a terceira malignidade mais comum, que corresponde mais de 30% de todos os cânceres relatados no país (SASAHIRA *et al.*, 2016; AZAD *et al.*, 2016).

No Brasil, as estimativas de CEO para o biênio 2016-2017, são de 15.490 novos casos, sendo 11.140 homens e 4.350 mulheres. A última estimativa mundial para o número de mortes por câncer de boca foi realizada em 2013, e os dados apontaram 5.401 casos, sendo 4.223 homens e 1.178 mulheres (INCA, 2016; AZAD *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços na prevenção do câncer oral e nos tratamentos multimodais, a taxa de sobrevivência de cinco anos é inferior a 50% e o prognóstico dos casos avançados não mudou consideravelmente nos últimos 20 anos. O diagnóstico precoce favorece não apenas o prognóstico do paciente como também reduz a morbidade e a necessidade de tratamentos mais agressivos (KAWAHARA *et al.*, 2016; SASAHIRA *et al.*, 2016).

1.3 FATORES ETIOLOGICOS

1.3.1 Tabagismo

A relação entre o consumo excessivo de tabaco e o risco de desenvolver câncer é bem estabelecido. Em humanos, por exemplo, o tabaco é o principal fator desencadeador de câncer de pulmão e desenvolvimento de adenomas e adenocarcinomas em todas as espécies de cânceres epiteliais testados. Independente da rota de administração, o tabaco aumenta em seis vezes o risco de desenvolver câncer oral se comparado a indivíduos não fumantes (KUMAR *et al.*, 2016; AZAD *et al.*, 2016; HECHT *et al.*, 2015).

Os agentes carcinogênicos presentes no tabaco e apontados como os maiores agressores são: o benzopireno e as nitrosaminas específicas do tabaco. A nicotina, componente importante do tabaco, não é um carcinógeno por si só, mas por conter as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNAs) tem sido implicada na progressão do câncer e metástase (WYSS *et al.*, 2016; YALCIN e DE LA MONTE, 2016; GUNDUZ *et al.*, 2016).

As TSNAs são formadas pelas nitrosaminas alcaloides, presentes somente na planta de tabaco, apontadas como fortes carcinógenos, considerados do tipo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), por apresentarem substâncias químicas com atividade carcinogênica comprovada em humanos. Neste grupo, são incluídas a N-nitrosonornicotina (NNN) e a cetona de nitrosamina derivada de nicotina (NNK) (figura 1) (WYSS *et al.*, 2016; YALCIN e DE LA MONTE, 2016; GUNDUZ *et al.*, 2016; BRELAND *et al.*, 2003).

NNN e NNK, juntas ao benzopireno, são altamente cancerígenas e seus metabólitos, ao se ligarem ao DNA, resultam na formação de adutos (formas de DNA resultantes da exposição a agentes cancerígenos de compostos estruturais diversos que se ligam covalentemente à molécula), implicados na malignidade celular e injúria tecidual, causando críticas mutações e alteração na replicação da molécula (HECHT *et al.*, 2015; XUE; YANG; SENG, 2014).

O alcatrão, outro componente encontrado no tabaco, é formado por várias substâncias cancerígenas e genotóxicas, que causa a morte e provoca danos funcionais das células epiteliais respiratórias ciliadas, por prejudicar a capacidade dessas células em capturar as partículas tóxicas, facilitando, desta forma, a entrada dos agentes a nível celular, desencadeando mutações e levando à formação do tumor (BRELAND; ACOSTA; EISSENBERG, 2003; YALCIN e DE LA MONTE, 2016; WYSS *et al.*, 2016)

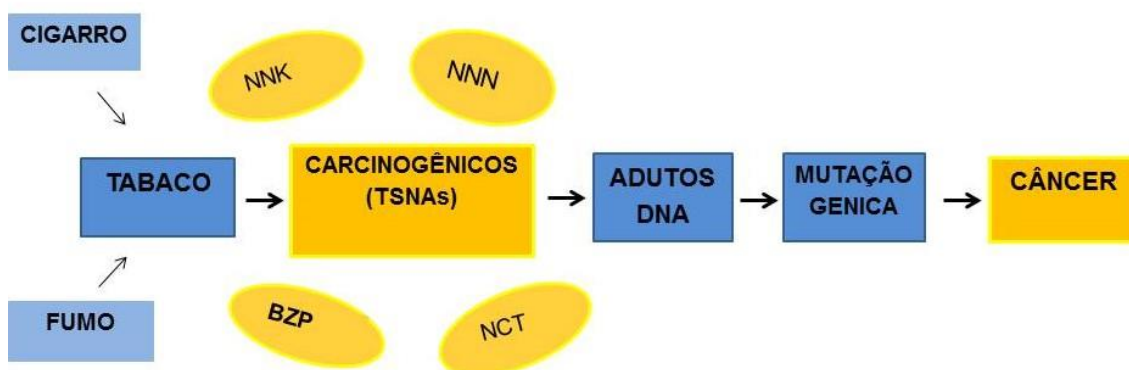


FIGURA 1: Mecanismo de promoção cancerígena, a partir da formação de adutos de DNA, através das nitrosaminas específicas do tabaco (TSNAs) presentes na planta de tabaco, em suas duas formas, o fumo e o cigarro. BZP: benzopireno; NCT: nicotina NNK: cetona nicotina-derivada da nitrosaminas; NNN: N-nitrosornicotina. (Fonte: Adaptado de HECHT *et al.*, 2015)

1.3.2 Etilismo

No mundo todo, a ingestão de álcool de forma abusiva tem sido um problema de saúde cada vez mais grave devido à carcinogenicidade do acetaldeído, primeiro e principal metabólito presente no etanol. Os maiores fatores de risco para câncer oral no mundo ocidental é o uso combinado de tabaco e álcool que, embora atuem como fatores de risco independentes, sua ação parece ser combinada (WYSS *et al.*, 2016; AZAD *et al.*, 2016; MARKOPOULOS, 2012).

Estudos epidemiológicos demonstram que o câncer oral é seis vezes mais propenso e representa um risco quinze vezes maior de se desenvolver em etilistas ativos (MARKOPOULOS, 2012). O consumo de bebidas alcoólicas é classificado como um carcinógeno humano tipo 1 e causalmente relacionado com um aumento do risco de câncer do trato gastrointestinal superior (ERIKSSON, 2015).

O etilismo tem sido associado a uma série de cânceres em diferentes órgãos, como a cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, estômago, cólon, reto, fígado, pâncreas, pulmão, mama, rim, bexiga, próstata, endométrio, ovários, testículos e cérebro (PENG; CHEN; HUO, 2016). No entanto, ocorre em maior frequência em regiões com oxidação alcoólica endógena, como o fígado e pâncreas, e com colonização microbiana, como o trato gastrointestinal superior (ERIKSSON, 2015).

O acetaldeído a partir da oxidação da enzima álcool-desidrogenase (ADH) e catalisação da aldeído-desidrogenase (ALDH), é altamente mutagênico e caracterizado como o mais importante mecanismo desencadeador de câncer, devido à sua capacidade de formar adutos de DNA exocíclicos (FIGURA 2). A diversidade de mecanismos carcinogênicos pode refletir a ampla interação entre etanol e cofatores do ambiente interno e externo (PENG; CHEN; HUO, 2016).

O acetaldeído é um composto citotóxico, genotóxico, mutagênico e clastogênico, mesmo em baixas concentrações (abaixo de 1 mM), podendo promover o desenvolvimento do câncer por meio de múltiplos mecanismos, incluindo a interferência na replicação e indução de danos, e a hipometilação do DNA, que altera a expressão de oncogenes e genes de supressão tumoral (ERIKSSON, 2015).

Na saliva humana normal não contém níveis mensuráveis de acetaldeído. Contudo, suas concentrações mutagênicas são encontradas na saliva durante e após a ingestão de álcool e do fumo. O tabagismo crônico tem mostrado modificar a microbiota oral para produzir mais acetaldeído a partir do etanol, tanto *in vitro* como *in vivo* (MARTTILA *et al.*, 2013).

A má higiene oral, dentre outros fatores, podem provocar o aumento da produção *in vitro* de acetaldeído na saliva. A microbiota do trato gastrointestinal e da cavidade oral produzem acetaldeído principalmente pela oxidação do etanol. Alguns microorganismos, incluindo *Candida spp.*, mostraram-se capazes de produzir níveis significativos de acetaldeído. A candidíase oral crônica tem sido associada ao carcinoma oral (ALNUAIMI *et al.*, 2015; MARTTILA *et al.*, 2013).

Os fumantes têm duas vezes mais acetaldeído na saliva do que os não-fumantes se consumirem a mesma quantidade de álcool. A fumaça de cigarro tem grandes quantidades de acetaldeído que se dissolve na saliva durante o fumo, e este, pode aumentar a capacidade de leveduras e bactérias orais em produzir mais acetaldeído a partir do etanol. Ademais, os mecanismos carcinogênicos associados ao álcool e tabagismo podem diferir, mas interagem para aumentar o risco (CAO e GIOVANNUCCI, 2016).

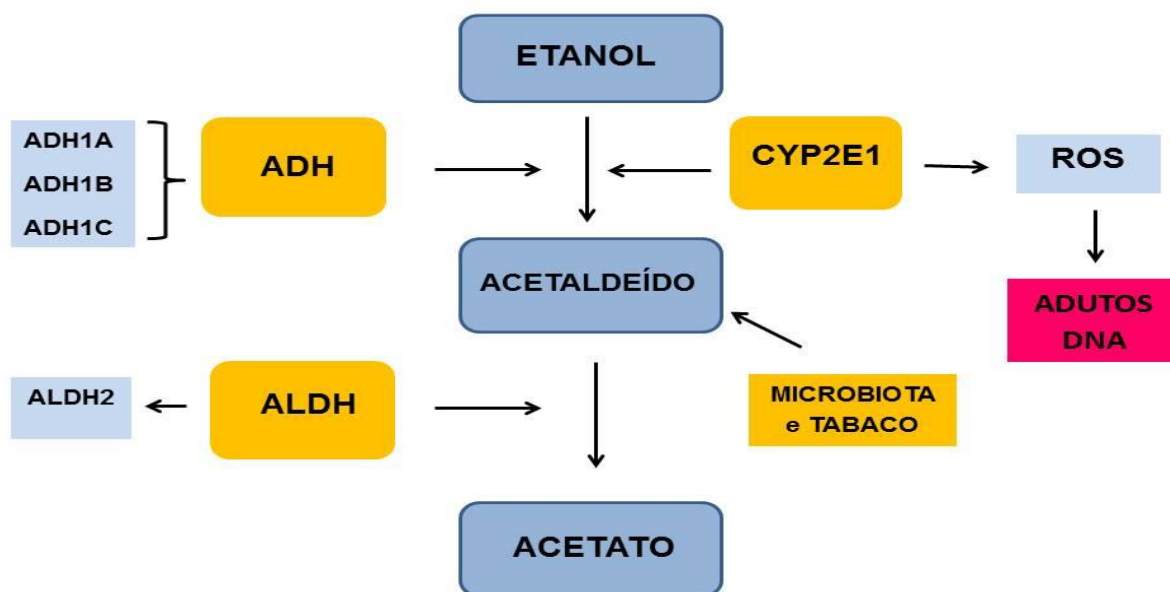


FIGURA 2: Metabolismo do etanol e seu papel na carcinogênese. O etanol é metabolizado em acetaldeído por álcool desidrogenase (ADH) e as principais subunidades são as codificadas pelos genes ADH1A, ADH1B e ADH1C. As enzimas do citocromo, em especial as codificadas pelo gene P450 2E1 (CYP2E1), também induzem a oxidação do acetaldeído, produzindo as espécies reativas de oxigênio (ROS), o que propicia a formação de adutos mutagênicos de DNA. O acetaldeído é ainda oxidado a acetato, não tóxico, por acetaldeído desidrogenase (ALDH), sendo primariamente catalisado com a aldeído desidrogenase codificada pelo gene ALDH2. A formação de acetaldeído, a partir do etanol presente na cavidade oral, pode ser aumentada pelos agentes da microbiota, devido a má higienização da cavidade oral e também pelas substâncias presentes no tabaco. (fonte: adaptado de SEITZ & STICKEL, 2007).

1.3.3 HPV

As infecções virais têm sido fortemente implicadas na indução da transformação maligna por interferência na fisiologia do ciclo celular de epitélios escamosos, incluindo o oral. Os vírus prototípicos implicados no desenvolvimento do câncer oral são os vírus do herpes humano, principalmente o vírus Epstein-Barr (EBV), o Papilomavírus Humano (HPV) e o vírus Herpes simplex (KUMAR *et al.*, 2016; ECHARRI; LOPEZ-MARTIN; HITT, 2016; KRISHNA *et al.*, 2015)

O EBV tem sido mais associado ao carcinoma de glândula salivar frequentemente referida como lesão linfoepitelial maligna. Um estudo observou que alguns adenocarcinomas de glândulas salivares espontâneos em animais revelavam a presença dessas partículas virais, porém a relação causal do EBV com CEO ainda não é clara (KUMAR *et al.*, 2016).

O HPV é um vírus de DNA circular epitelial, não envelopado, de cadeia dupla, que pertence à família *Papovaviridae*. Os papéis da infecção pelo HPV na gênese do câncer de cabeça e pescoço (CCP) têm atraído muita atenção. A maioria dos casos de CCP HPV positivos originam-se da região orofaríngea, pois acredita-se que seja bastante vulnerável à lesão epitelial pela ausência da camada de queratina protetora (KUMAR *et al.*, 2016; ECHARRI; LOPEZ-MARTIN; HITT, 2016; MARKOPOULOS, 2012).

Certos tipos de HPV, denominados tipos de “alto risco”, estão associados com lesões pré-malignas orais. O HPV 16 é o tipo mais comum encontrado nos cânceres genitais, também é o mais comum nos cânceres orais, o que indica claramente a possível fonte de infecção pelo HPV na cavidade oral (KUMAR *et al.*, 2016; KRISHNA *et al.*, 2015)

A infecção pelo HPV tem sido relacionada à carcinogênese, mais precisamente suas proteínas oncogênicas E6 e E7, através de sua interação com os genes *TP53* e *RB*. E6 tem a capacidade de degradar a proteína supressora tumoral p53 (*tumor protein p53*), a qual regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M. A oncoproteína E7 liga-se a proteína pRb (*RB transcriptional corepressor 1*), ativando fatores de transcrição que induzem a transcrição de genes, os quais promovem a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S (KUMAR *et al.*, 2016; KRISHNA *et al.*, 2015)

Desta forma, os genes E6 e E7 do vírus HPV atuam no processo de indução da transformação celular e carcinogênese, sendo estes genes, considerados de maior potencial de transformação do vírus. Os estudos produzidos até então, não permitem definir o papel do HPV na carcinogênese. A desregulação funcional destas moléculas-chaves oncosupressoras resulta numa proliferação celular descontrolada e no distúrbio da apoptose, levando ao câncer oral (KUMAR *et al.*, 2016; KRISHNA *et al.*, 2015).

1.4 CARCINOGENESE

O câncer é uma doença genética proveniente de diversas mutações acumulativas resultantes de alterações genéticas e epigênicas provocadas por agentes endógenos e exógenos (HYNDMAN, 2016). Estas mutações estão associadas ao descontrole de programas essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. As mutações podem ocorrer nos genes de reparo, genes supressores tumorais e proto-oncogenes, levando ao desenvolvimento tumoral (LÓPEZ-LÁZARO, 2016).

Em condições fisiológicas normais, as vias de transdução de sinais controlam a divisão, a proliferação, a diferenciação, a senescência, adesão e apoptose celular, regulando a biologia oral dos ceratinócitos (KRISHNA *et al.*, 2015). Já na carcinogênese, ocorre um processo complexo em que vários eventos alteram quantitativamente a via fisiológica. (KRISHNA *et al.*, 2015; JUREL *et al.*, 2014).

Os danos genéticos e epigênicos podem ativar mutações em proto-oncogenes e genes supressores tumorais, com ganho e perda de função. Respectivamente, tais eventos levam à desregulação do ciclo celular à medida que o crescimento torna-se autônomo e mecanismos invasivos se desenvolvem (JUREL *et al.*, 2014). As mutações podem ocorrer nos fatores ou receptores de fator de crescimento, transdutores de sinal intracelulares, nos inibidores da apoptose e reguladores do ciclo celular (HYNDMAN, 2016; JUREL *et al.*, 2014; MARKOPOULOS, 2012).

Os oncogenes são os genes que sofrem mutações de ganho de funções sobre a regulação proliferativa antes controlada (proto-oncogenes), cujos mecanismos de ativação incluem mutações pontuais e rearranjos de DNA que estão provavelmente envolvidos na iniciação e progressão da neoplasia oral. (HYNDMAN, 2016; JUREL *et al.*, 2014).

O campo de cancerização é uma teoria da carcinogênese oral, a qual baseia-se na formulação de que a uma exposição do epitélio oral a fatores carcinogênicos, toda a área está em maior risco para o desenvolvimento de lesões malignas pela acumulação de alterações (RIVERA e VENEGAS, 2014; MARKOPOULOS, 2012; HOMSTRUP, 2009; SLAUGHTER *et al.*, 1953).

Segundo essa teoria, alterações moleculares iniciais em células de reserva levariam a formação de um campo alterado, o qual apresenta clinicamente de aparência normal e não é possível de ser visualizado pelo profissional de saúde. Logo em seguida, este campo sofre expansão e se estende sobre uma superfície maior da mucosa (RIVERA e VENEGAS, 2014; MARKOPOULOS, 2012; HOMSTRUP, 2009; SLAUGHTER *et al.*, 1953).

Estima-se que para que haja transformação celular maligna em CEO, ocorra cerca de seis mutações somáticas, combinada há anos de exposição aos carcinógenos relacionados (Wright, 1998). À medida que a célula acumula estas alterações ou mutações, torna-se funcionalmente independente do epitélio oral circundante constituído por funções celulares normais e controlada, aumentando assim a capacidade de proliferação (JUREL *et al.*, 2014).

Alterações moleculares adicionais levam ao aparecimento de uma lesão precursora ou suscetível a câncer. Novas alterações genéticas ou epigenéticas podem levar à transformação maligna da lesão precursora ou o aparecimento de nova lesão precursora próxima da lesão transformada. Mesmo com a excisão do carcinoma, a mucosa de aparência clínica normal exibe alterações moleculares que podem leva-la a formação de novas lesões precursoras ou carcinomas (RIVERA e VENEGAS, 2014; MARKOPOULOS, 2012; HOMSTRUP, 2009; SLAUGHTER *et al.*, 1953).

A medida que o tumor cresce e invade, tornando-se ainda mais agressivo, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, processo denominado neoangiogênese, o qual é essencial na formação de tumores provocando maior invasividade e metástases a partir do local primário para tecidos adjacentes ou à distância (JUREL *et al.*, 2014; MARKOPOULOS, 2012).

A via de sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR desempenha importantes papéis nos diversos processos fisiológicos normais, incluindo sobrevivência, migração,

proliferação, diferenciação celular, angiogênese, síntese de proteínas e metabolismo da glicose, além de estar associada a uma série de processos oncogênicos. PI3K/AKT/mTOR é uma das vias de sinalização mais frequentemente desreguladas no câncer, incluindo os carcinomas de cabeça e pescoço (GARCÍA-CARRACEDO *et al.*, 2016; SIMPSON; MELL; COHEN, 2015).

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) é uma mediadora *downstream* dos receptores da membrana celular tirosina quinases (RTKs) que são fosforilados após a ligação com o fator de crescimento. Em carcinoma de cabeça e pescoço, o heterodímero de EGFR e PI3K apresenta-se superexpresso, ativando PI3K. A forma ativada de PI3K fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), gerando fosfatidilinositol-trisfosfato (PIP3), o qual inicia a ativação de AKT por sua translocação para a membrana plasmática, levando a uma alteração conformacional e sua fosforilação (GARCÍA-CARRACEDO *et al.*, 2016; SIMPSON, MELL e COHEN, 2015).

AKT, uma serina/treonina cinase, é um mediador central da via PI3K, e sua ativação fosforila ainda mais proteínas múltiplas que regulam numerosas respostas celulares, incluindo apoptose, metabolismo, proliferação celular e crescimento celular. O AKT ativado promove síntese protéica e proliferação celular por ativação do complexo mTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin*), o qual fosforilado ativa cinases que alteram a tradução de RNA mensageiro e impulsiona o crescimento celular. O AKT ativado também promove a degradação da proteína supressora tumoral p53 (GARCÍA-CARRACEDO *et al.*, 2016; SIMPSON; MELL; COHEN, 2015).

Alguns fatores transcricionais, ou proteínas que regulam a expressão de outros genes, também são alterados no câncer oral. A remodelação das expressões gênicas é um importante desfecho na alteração das vias intracelulares. Acredita-se que os fatores de transcrição, como o *EGFR* e *TWIST1* (*Twist related protein 1*), sejam importantes promotores na proliferação celular e desenvolvimento do câncer oral (JUREL *et al.*, 2014).

Além da predisposição genética intensificar a progressão tumoral, a exposição crônica a carcinógenos, como o benzopireno no tabaco podem modular a expressão *TWIST1* e promover a migração e invasão de células cancerígenas, danificando o material genético (MARKOPOULOS, 2012).

1.4.1 Transição Epitelial-Mesenquimal e Metástase

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo biológico que ocorre no período embrionário pelo qual as células epiteliais perdem polaridade, adesões célula-célula (figura 3) e sofrem remodelação dramática do citoesqueleto que as permite dissociar-se, como consequência de múltiplas alterações bioquímicas e estruturais e atingir o fenótipo de células mesenquimais (SMITH e BHOWMICK, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009).

Uma série de processos moleculares distintos é desencadeada para iniciar uma TEM e permitir que ela progrida, estes incluem a ativação de fatores de transcrição e aumento significativo da produção de componentes de membrana extracelular. O processo de TEM confere à célula capacidade migratória, invasividade e elevada resistência à apoptose (SMITH e BHOWMICK, 2016; DIEPENBRUCK e CHRISTOFORI, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009; ALBERTS *et al.*, 2009).

A TEM é acompanhada pela expressão de novas proteínas de adesão e moléculas de sinalização, que orientam a migração de células disjuntas para seu alvo tecidual e pela expressão de fatores de transcrição, os quais controlam o destino das células mesenquimais, expressão de proteínas de superfície celular específicas, produção de enzimas de degradação da matriz extracelular e alterações na expressão de microRNAs específicos (DIEPENBRUCK e CHRISTOFORI, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009).

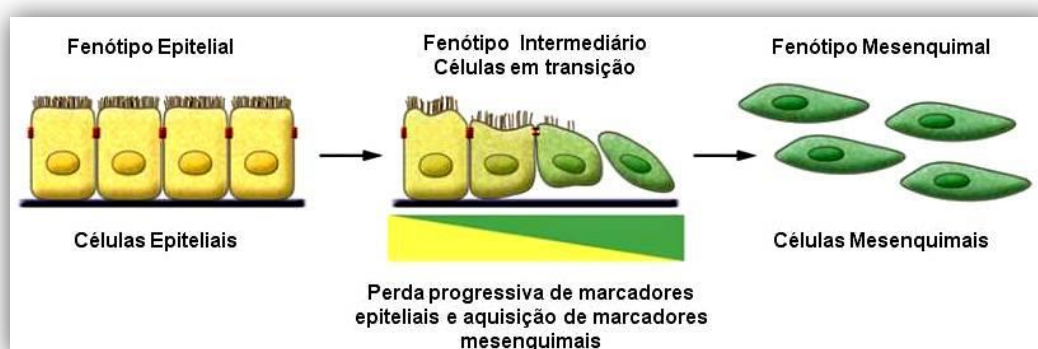


FIGURA 3: Transição epitelial-mesenquimal: O programa de TEM envolve a transição funcional das células epiteliais polarizadas em células mesenquimais com mobilidade e secretoras de componentes da matriz extracelular. Fonte: Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009.

Os exemplos mais bem estudados de TEM são aqueles que acompanham eventos morfogênicos durante o desenvolvimento metazoário precoce, quando as células do epitélio embrionário inicial são internalizadas para produzir tecido da mesoderme, durante a gastrulação de *Drosophila*, onde a TEM foi observada pela primeira (MOLY *et al.*, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009; ZHENG *et al.*, 2015).

A TEM é encontrada em três configurações biológicas distintas que carregam diferentes consequências funcionais (Figura 4). A TEM tipo 1 está associada à implantação, formação de embriões e desenvolvimento de órgãos organizados para gerar diversos tipos de células que compartilham fenótipos mesenquimais comuns (SMITH e BHOWMICK, 2016; ZHENG *et al.*, 2015; KALLURI e WEINBERG, 2009).

A TEM tipo 2 relaciona-se com a cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e reparação gerada por fibroblastos e outras células relacionadas a este processo. Já a TEM tipo 3, ocorre em células neoplásicas que sofreram alterações genéticas e epigênicas, especificamente em genes que favorecem o crescimento clonal e o desenvolvimento de tumores localizados (SMITH e BHOWMICK, 2016; ZHENG *et al.*, 2015; KALLURI e WEINBERG, 2009).

Estas alterações, afetam notavelmente oncogenes e genes supressores tumorais e conspiram com o circuito fisiológico regulador de TEM. Células de carcinoma submetidas a TEM tipo 3 podem invadir e assim gerar a progressão do câncer e metástases subsequentes (SMITH e BHOWMICK, 2016; ZHENG *et al.*, 2015; KALLURI e WEINBERG, 2009).

Alguns fatores de transcrição como Twist, Snail e Slug foram observados juntamente ao processo de TEM, e estes coordenam mudanças em larga escala na expressão de genes zigóticos para induzir as mudanças na forma celular, adesão e polaridade necessária para a internalização do mesoderma e TEM (MOLY *et al.*, 2016; HEERBOTH *et al.*, 2015; KALLURI e WEINBERG, 2009; ZHENG *et al.*, 2015).

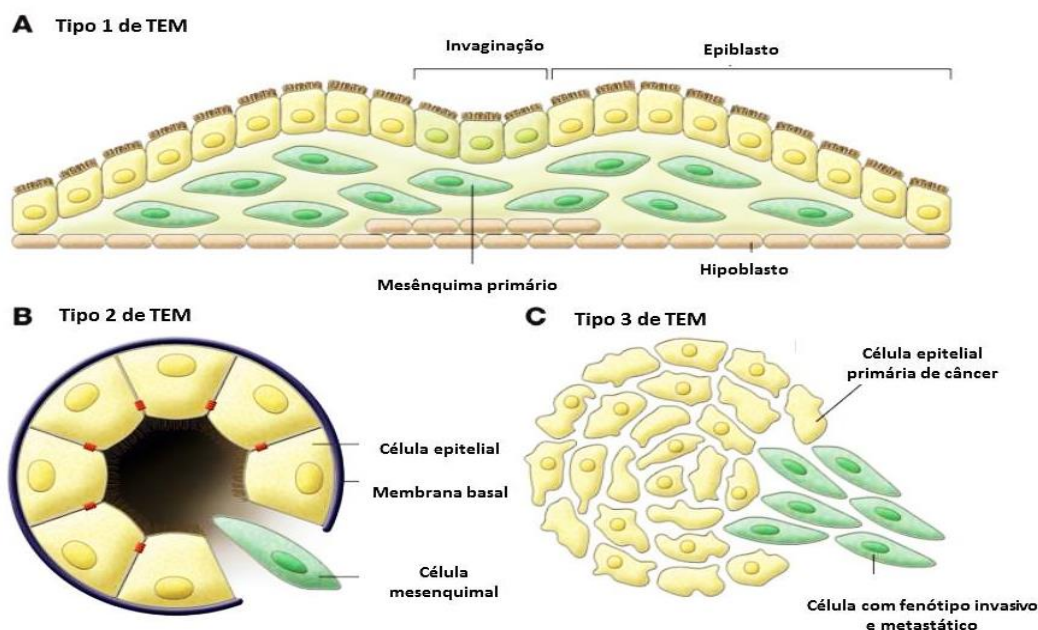


FIGURA 4: Diferentes tipos de TEM. (A) A TEM tipo 1 está associada à implantação e à gastrulação embrionária e dá origem ao mesoderma e à endoderme e às células móveis da crista neural, culminando na formação de tecido conjuntivo. (B) TEM tipo 2, contexto de inflamação e fibrose onde é expresso durante longos períodos de tempo e pode eventualmente destruir um órgão afetado se a inflamação primária não for atenuada. (C) TEM de tipo 3, onde epitélios secundários diversos podem se transformar em células cancerígenas que posteriormente sofrem o processo de TEM, permitindo invasão e metástase tecidual. Fonte: Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009.

A proliferação excessiva de células epiteliais e a angiogênese são indicações da iniciação e do crescimento precoce dos cânceres epiteliais primários. A ativação de TEM resulta na aquisição de invasividade, inicialmente manifestada por invasão através da membrana basal, levando à disseminação metastática, que também é facilitada pela ruptura das junções aderentes intercelulares e adesões célula-membrana extracelular mediadas por integrinas (SMITH e BHOWMICK, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009).

Logo, a TEM vem sendo proposta como um mecanismo crítico para a aquisição de fenótipos malignos por células de câncer epitelial. A indução de uma TEM é provavelmente um mecanismo central importante para a progressão de carcinomas para uma fase metastática (SMITH e BHOWMICK, 2016; KALLURI e Weinberg, 2009).

A superfamília de caderinas consiste em receptores transmembranares homofílicos de célula-célula dependentes de cálcio (Ca^{+2}). A E-caderina é um marcador crítico de células epiteliais, como tal, o controle dinâmico de sua expressão e atividade

desempenham papel fundamental no estabelecimento e na estabilidade de epitélios durante o desenvolvimento (SEONG; YUAN; ARIKKATH, 2016).

E-caderina é tão importante para a manutenção da arquitetura do tecido adulto quanto do tecido embrionário (SEONG; YUAN; ARIKKATH, 2016). Pode-se verificar que a perda da função da E-caderina está generalizada em tumores epiteliais esporádicos e que é proposto ser importante no desenvolvimento da maioria, senão de todos os tipos de tumores derivados do epitélio, devido ao bloqueio dessa glicoproteína ser suficiente para desencadear TEM em mamíferos (SEDGWICK e D'SOUZA-SCHOREY, 2016; GUO *et al.*, 2016).

Além disso, a perda da função da E-caderina nos tumores resulta na rápida progressão de um adenoma benigno para um carcinoma invasivo metastático. Tais observações levaram a conclusão que, a perda de E-caderina pode contribuir para a TEM tanto pela perda da adesão intercelular quanto pela alteração da sinalização através da ancoragem ou supressão de proteínas citoplasmáticas associadas (SEDGWICK e D'SOUZA-SCHOREY, 2016; GUO *et al.*, 2016).

A β -catenina é um exemplo dessas proteínas citoplasmáticas (SEONG; YUAN; ARIKKATH, 2016). Logo, a perda da expressão de E-caderina em tumores está associada a um mau prognóstico clínico em uma variedade de tumores de origem epitelial. Uma variedade de estímulos desencadeia a TEM, no entanto, muitos destes sinais parecem convergir para o mesmo ponto crítico: a expressão e/ou função alterada das caderinas (KONG *et al.*, 2015; HUI *et al.*, 2013)

Em contraste com a E-caderina, outras caderinas podem ser encontradas associadas à TEM, como a *N-caderina*, proteína presente em fibroblastos, cuja expressão é frequentemente regulada positivamente durante a TEM, conferindo às células um aumento na motilidade, invasão e progressão tumoral. Devido a isso, o equilíbrio entre a expressão de E-caderina e N-caderina é proposto como um dos fatores contributivos para desencadear a TEM (KONG *et al.*, 2015; HUI *et al.*, 2013).

A manutenção da β -catenina, proteína citoplasmática de ancoramento que dá suporte ao citoesqueleto, é imprescindível para a estabilidade funcional das caderinas e sua ligação aos filamentos de actina (SEONG; YUAN; ARIKKATH, 2016). Dessa

forma, a alteração do local de ação de β -catenina, prejudica a integridade epitelial medida pela E-caderina gerando sua perda de adesão hemofílica e alteração da expressão gênica (TANABE *et al.*, 2016).

O acúmulo de β -catenina no núcleo, através de seu egresso do citoplasma onde é o seu local de ação, está frequentemente associado à perda da expressão da E-caderina, correlaciona-se com a susceptibilidade ao processo de TEM e aquisição de um fenótipo invasivo em processo patológico, como o câncer (WU *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2016) (figura 5).

Notavelmente, as funções da β -catenina são desreguladas nos processos de malignidades, consequentemente alterando negativamente as funções da E-caderina, caracterizando a perda de adesão célula-célula e também o aumento da transcrição de genes alvo na via de sinalização do WNT, alguns dos quais são oncogenes (WU *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2016; KALLURI e WEINBERG, 2009).

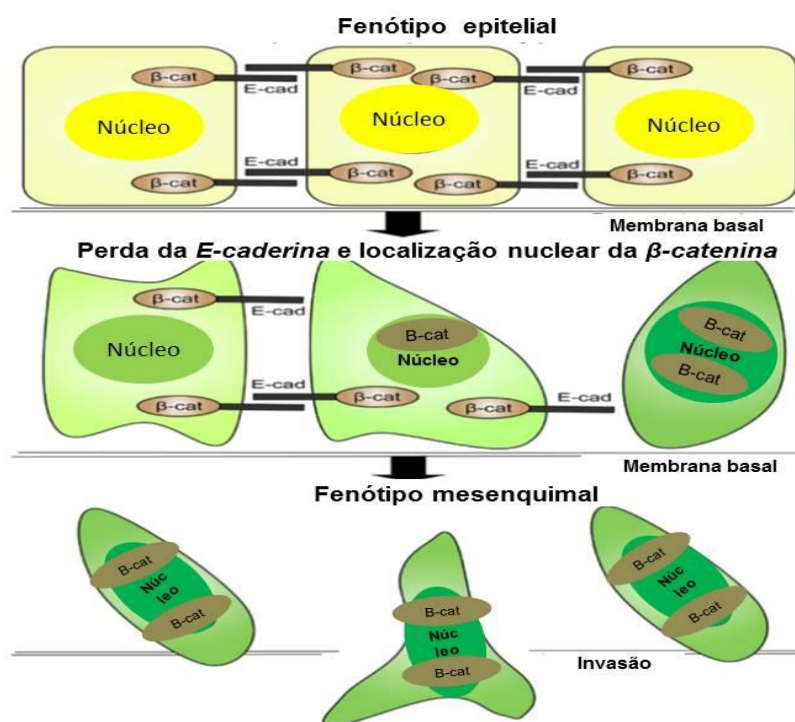


FIGURA 5: Regulação negativa de E-caderina pela β -catenina, desencadeando o processo de TEM, no qual as células epiteliais sofrem modificação fenotípica profunda e se transformam em células mesenquimais, adquirindo a capacidade de migração e invasão. (fonte: adaptado de WU *et al.*, 2016).

A via de sinalização WNT desempenha um papel central na proliferação celular durante a embriogênese e em diversos processos patológicos, como o câncer

(SEDGWICK e D'SOUZA-SCHOREY, 2016; TANABE *et al.*, 2016). As moléculas de sinalização Wnt formam uma família de glicoproteínas da membrana extracelular que sinalizam com os receptores específicos (XU *et al.*, 2016).

Os ligantes de Wnt ativam várias vias conhecidas, como a via canônica Wnt/ β -catenina, cuja desregulação da sinalização está envolvida em múltiplos tumores regulando a iniciação, crescimento tumoral e a metástase. A maioria dos genes-alvo de Wnt são transativados pela sua via de sinalização e assim servem como efetores (SEDGWICK e D'SOUZA-SCHOREY, 2016; TANABE *et al.*, 2016).

Entre esses efetores estão *c-MYC*, *ZEB1* e *TWIST1*, fatores transcricionais que podem modular a transcrição de numerosos genes e transformar os sinais de *WNT* em uma resposta de genoma completo (WU *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2016). Na regulação negativa da ativação dos sinais de E-caderina e Wnt, tanto os níveis citoplasmáticos como nucleares de β -catenina aumentam onde interagem com o crescimento celular e TEM (TANABE *et al.*, 2016) (figura 6).

O complexo E-caderina/ β -catenina permite junções celulares estáveis. A β -catenina, proteína-chave na sinalização de *WNT*, separa-se do complexo de degradação, acumula-se no citoplasma e transloca-se para o núcleo subsequentemente para sensibilizar a via *WNT* durante a progressão do (TANABE *et al.*, 2016; SEDGWICK e D'SOUZA-SCHOREY, 2016).

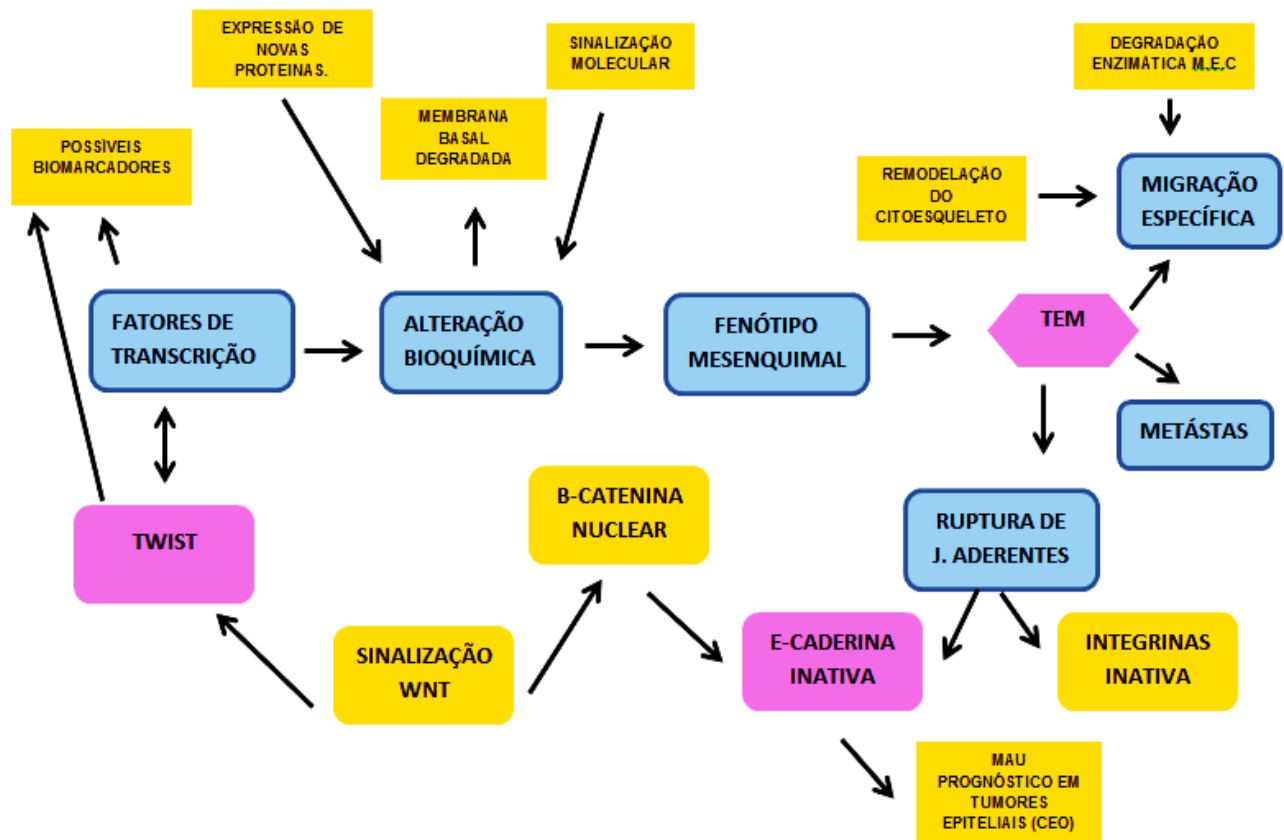


FIGURA 6: mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvida durante o processo de iniciação de TEM. (fonte: elaborada pelo autor)

Diversos estudos demonstram que outro fator preponderante à indução de TEM, através de alteração na via *WNT* e proteínas E-caderina, N-caderina e β -catenina, é o gene *TWIST1*, que é encontrado silenciado na maioria dos tecidos adultos saudáveis, porém hiperexpresso em diversos tipos de carcinomas, cooperando com motilidade celular, invasividade e metástase (REN *et al.*, 2016; PALLIER *et al.*, 2012).

1.4.2 O Gene *TWIST1*

O gene *TWIST1* ou *TWIST*, foi identificado pela primeira vez em *Drosophila*, como um dos genes zigóticos essenciais para a formação da mesoderme e também no processo de diferenciação de diversos tipos de tecidos durante o desenvolvimento embrionário inicial (CHEN e WU, 2015; ZHENG *et al.*, 2015).

A origem do nome *TWIST1* (ou “Torção” em português) foi baseado nas observações feitas nos embriões de *Drosophila* que na ausência do gene *TWIST1* não passavam pelo processo de gastrulação normal, não produziam a formação da mesoderme e morriam ao final da embriogênese (TSENG *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2012).

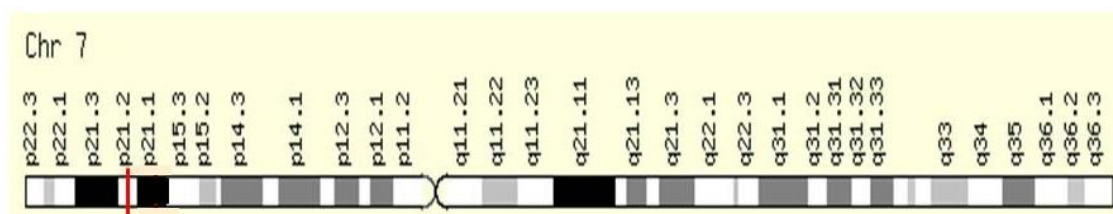


FIGURA 7: Localização do gene *TWIST1* no cromossomo 7(p21. 2). Fonte: GeneCards, 2016.

O gene *TWIST1* está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p21.2) (figura 7) e codifica um fator de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH), que possui similaridade com outro fator de transcrição bHLH, o *TWIST2* (*DERMO1*) (PIRINEN e SOINI, 2013; WALLERAND *et al.*, 2010).

A expressão deste gene é fortemente encontrada em tecido embrionário, principalmente o placentário, nas células trofoblásticas, por estar ligado ao processo de transição epitelial-mesenquimal (PIRINEN e SOINI, 2013; WALLERAND *et al.*, 2010). A expressão de *TWIST1* é encontrada durante os três trimestres intrauterinos, está ligado ao controle de muitos órgãos e tecidos neste período e também em derivados do mesoderma, tecidos conjuntivos em adultos, como os músculos lisos e estriados, células do sangue e medula óssea, órgãos reprodutores e excretórios (PIRINEN e SOINI, 2013; WALLERAND *et al.*, 2010).

Durante o período de início da gastrulação, os níveis de expressão de *TWIST1* são altamente elevados na camada mesodérmica dos embriões e é quantitativamente semelhante entre todas as células que participam da invaginação do sulco ventral (PIRINEN e SOINI, 2013; WALLERAND *et al.*, 2010).

Ademais, é responsável pelo controle da expressão de várias citocinas inflamatórias e também nos mecanismos da via de sinalização hedgehog, que dá às células embrionárias informações para o embrião desenvolver-se de maneira correta (PIRINEN e SOINI, 2013; WALLERAND *et al.*, 2010).

Em humanos, *TWIST1* foi identificado pela primeira vez na síndrome Saethre-Chotzen (SCS), que apresenta-se como autossômica dominante, sendo caracterizada por uma série de má formações ósseas do crânio e da face, as quais devem-se ao fato do gene também estar relacionado à regulação de vários genes de auxílio na formação óssea, como os genes *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) e *RUNX2* (*runt related transcription factor 2*) (TAHIRI, *et al* 2015; BESSENYEI, *et al.*, 2014; BIALEK ; KERN; YANG, 2004).

O gene *RUNX2* atua na diferenciação e manutenção óssea e cartilaginosa, possuindo um papel crítico na regulação. Acredita-se que *TWIST1* mantém as células mesenquimais indiferenciadas através da regulação negativa de *RUNX2*, cuja expressão para a diferenciação osteoblástica só ocorre após uma diminuição da expressão de *TWIST1* (TAHIRI *et al.*, 2015; BESSENYEI *et al.*, 2014; BIALEK; KERN; YANG, 2004).

Em estudos realizados em *Drosophila*, foi demonstrado que *TWIST1* induz diretamente a expressão de *FGFR* (*Fibroblast Grow Factor Receptor*) e que a mutação deste gene, o *FGFR*, em humanos é transportada juntamente à mutação de *TWIST1* em casos da SCS (TAHIRI *et al.*, 2015; BESSENYEI *et al.*, 2014; CONNERNEY *et al.*, 2006).

TWIST1 e *FGFR2* estão relacionados ao processo de sinalização e manutenção nas células embrionárias, onde *TWIST1* atua como regulador das vias *FGF* (*Fibroblast Grow Factor*) no processo de embriogênese e *FGFR2* desempenha importante papel no desenvolvimento ósseo, em especial durante o período embrionário (TAHIRI *et al.*, 2015; BESSENYEI *et al.*, 2014; CONNERNEY *et al.*, 2006).

A expressão ectópica de *TWIST1* está diretamente ligada ao processo de progressão da malignidade tumoral, TEM, invasão e metástases, enquanto sua supressão tem efeito oposto indicando função altamente oncogênicas para este gene. *TWIST1* tem sido descrito estar expresso em vários tipos de cânceres invasores, incluindo o câncer oral, mama, pulmão, bexiga e fígado (XU *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2012).

A superexpressão de *TWIST1* tem sido observada em tecidos tumorais de CEO quando comparados a tecidos normais, indicando que *TWIST1* pode ter uma relação com a carcinogênese oral. Diferenças significativas na expressão gênica podem ser observadas nos grupos com baixa diferenciação, estágio clínico avançado, presença de metástase linfonodal e recidiva local, respectivamente (ZHOU *et al.*, 2015).

Estudos em carcinoma mamário metastático têm mostrado que a expressão ectópica de *TWIST1* resulta na perda de adesão mediada por E-caderina, ativa marcadores mesenquimais e induz a motilidade celular, sugerindo que *TWIST1* promove TEM. Já a supressão deste gene inibe a capacidade metastática da glândula mamária para o pulmão (PALLIER *et al.*, 2012)

Estudos em câncer de pulmão mostram que o silenciamento de *TWIST1* suprime a invasão e metástase, acompanhando aumento da expressão da E-caderina e diminuição da expressão da N-caderina e vimentina (WEI *et al.*, 2016), sugerindo que Twist funcione como uma oncoproteína, e sua expressão aumentada está positivamente correlacionada a invasividade e mau prognóstico clínico (HUI *et al.*, 2013).

Análises na expressão de RNA revelam alteração entre tecidos normais e amostras de tumor avançado de CEO em diversos genes que alteram as interações intercelulares e as vias de transdução de sinais envolvidos nos processos de motilidade e invasão, entre esses *TWIST1*, cuja expressão foi fortemente correlacionada com a supressão da expressão de E-caderina, propiciando invasividade e diagnóstico desfavorável em CEO (KONG *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão do gene *TWIST1* em espécimes de CEO provenientes de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde no Estado do Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há alteração na expressão de RNAm do gene *TWIST1* em CEO;
- Identificar se há relação entre o estadiamento dos tumores e a alteração da expressão neste gene;
- Correlacionar a expressão do gene *TWIST1* com as demais características clínico-patológicas dos tumores estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram avaliados um total de 48 pacientes, destes, 35 pacientes confirmados com CEO pela patologia clínica bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), através de análise imunohistoquímica, e 13 pacientes voluntários sadios também da patologia clínica bucal do HUJBB. Vale ressaltar que o presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e Pesquisa e possui fomento sob edital nº 011/2013 PPSUS – 2013/FAPESPA.

3.2 AMOSTRAS

Na correlação dos dados clínicos-patológicos pode-se observar que dos 35 casos registrados de pacientes portadores de CEO, 85,7% (30) corresponderam a pacientes acima de 50 anos. Em relação a gênero, 51% (18) dos pacientes com CEO, corresponde ao gênero masculino. A utilização simultânea de álcool e tabaco foi o hábito mais frequente relatado em 90% (31) dos pacientes avaliados de ambos os gêneros.

Com base na classificação TNM, o tamanho tumoral "T1 ou T2" apresentou-se em 51,42% (menor agressividade) "T3 ou T4" (maior agressividade) (48,57%) e a ausência de metástase linfonodal regional "N0" (67,7%) foram mais frequentemente relatados. A presença de metástases distantes não pôde ser observada no momento do diagnóstico (tabela 1).

Características		Frequência	
		Absoluta	Percentual
Gênero	Masculino	18	51%
	Feminino	17	49%
Idade	≥ 50	30	86%
	≤ 50	5	14%
Localização	Língua / Assoalho Bucal	13	37%
	Outras Localizações	22	63%
Tamanho	T1-T2	18	51%
	T3-T4	17	49%
Metástase Linfonodal	NO	24	68%
	Outros	11	32%
Metástase a Distância		Mx	0%
Tabagismo	Fumante	27	77%
	Não Fumante	6	17%
Etilismo	Etilista	19	54%
	Não Etilista	14	40%
Tabagismo e Etilismo		17	48%

TABELA 1: frequência absoluta e percentual dos dados clínico-patológicos dos 35 pacientes estudados.

3.3 PCR TEMPO REAL

O RNA total das amostras foi extraído utilizando o RNeasy mini kit (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA foram determinadas através do SpectraMax® i3 Multi-Mode Detection Platform e géis de agarose a 1%.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando kit de conversão High-Capacity cDNA, de acordo com o protocolo do fabricante (Life technologies®). A sonda alvo (*TWIST*) bem como controle endógeno utilizados foram do sistema TaqMan (Thermo Fisher Scientific®).

Como controle endógeno, foi selecionado um gene de expressão basal (*GAPDH*), sendo considerado ideal para estudos com amostras ou linhagens de CEO (ZHENG *et al* 2015; YANG *et al.*, 2010).

Todas as reações q-PCR foram realizadas em triplicata para o gene alvo, bem como para os controles endógenos. A quantificação relativa (RQ) da expressão gênica foi calculada pelo método do Ct comparativo, na qual ΔC_t representa a diferença limiar no

número de ciclos entre o gene alvo e controle endógeno, e $\Delta\Delta C_t$ representa a diferença entre o grupo teste e o calibrador.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram avaliados pelos testes de Mann-Whitney, Shapiro-Wilk, Teste T e Qui-Quadrado e correlacionados com os dados clínicos-patológicos dos carcinomas epidermóides bucais estudados, através dos programas estatísticos Bioestat[®] versão 5.3 (Ayres *et al.*, 2011) e SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL). E foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos deste estudo foram conduzidos com a finalidade de verificar o padrão de expressão do gene *TWIST1* em espécimes de CEO e espécimes orais sadios a fim de correlacionar a quantificação da expressão com alguns dados clínicos, como também correlacionar os dados clínicos entre si (gênero, idade, localização anatômica, tamanho do tumor, estadiamento, hábitos de tabagismo e etilismo) em 35 pacientes com CEO.

A avaliação da distribuição dos pacientes sadios e portadores de CEO foi analisada pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk, onde foi percebido que os dados não estavam distribuídos num padrão de normalidade, após isso foi realizada a comparação entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney, evidenciando o valor estatístico de $p < 0,0001$.

O presente estudo demonstrou diferenças significativas na expressão de *TWIST1* quando comparada à tecidos orais sadios. Baseando-se na diferença do threshold de ciclagem médio (cT) entre os grupos, observamos que os tumores estavam com a expressão de *TWIST1* cerca de 25 vezes maior do que em tecidos sadios (figura 8) (gráfico 1).

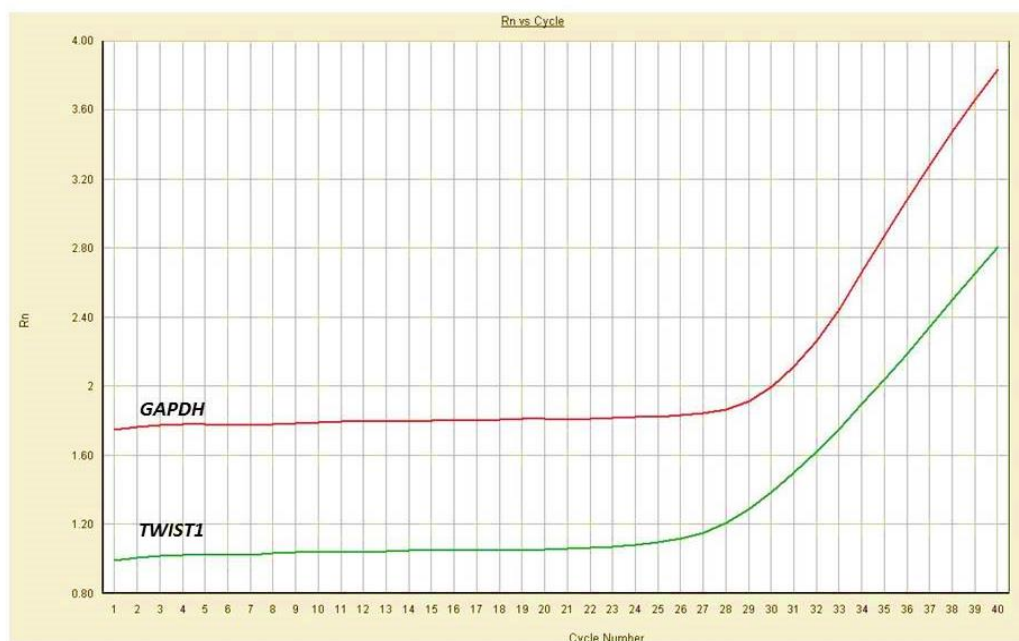


FIGURA 8: Reação de q-PCR com o gene alvo *TWIST1* e *GAPDH* em amostra de paciente portador de CEO. (Fonte: elaborada pelo autor).

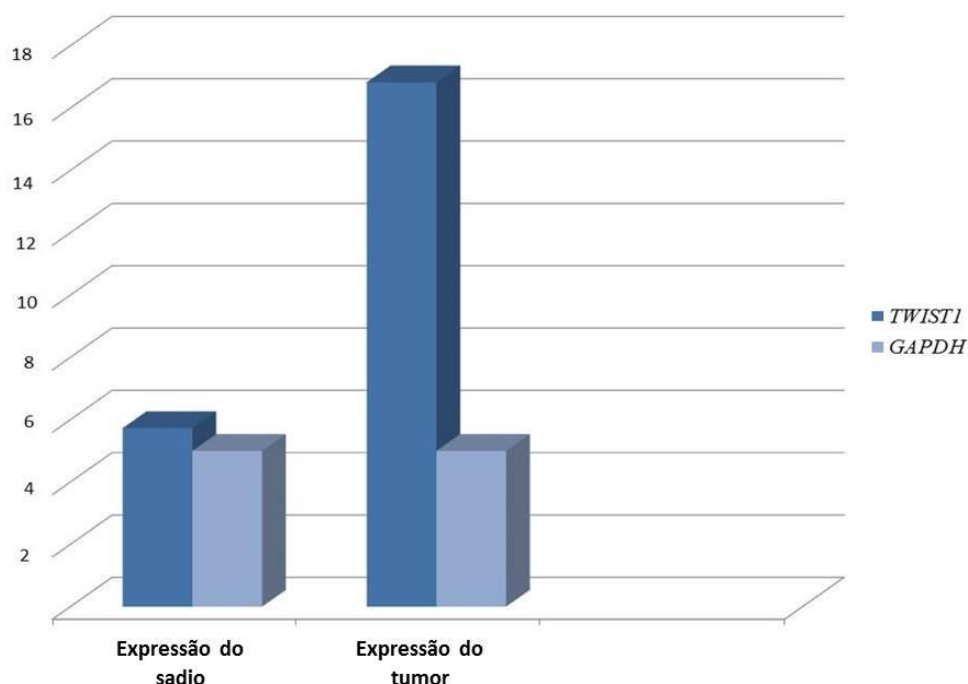


GRÁFICO 1: Relação da expressão de *TWIST1* em tecidos tumorais quando comparados a tecidos não tumorais saudáveis.

As vias exatas pelas quais *TWIST1* regula o início e a progressão do câncer ainda são desconhecidas. O que já está bem elucidado é que o fator de transcrição *TWIST1* é um importante regulador positivo que ativa TEM em células cancerígenas e ativa diversos genes-alvo que promovem a dediferenciação e mobilidade celular (Tanabe *et al.*, 2016). O gene *TWIST1* está superexpresso em vários tumores sólidos de caráter epitelial, incluindo as formas agressivas e metastáticas (XU *et al.*, 2016; QIN., *et al.*, 2012).

Kong *et al.* (2015) avaliaram a expressão de *TWIST1* e *ZEB2*, dois fatores transcricionais do período embrionário, em CEO como um possíveis marcadores de TEM. Notavelmente, a co-expressão de *TWIST1* e *ZEB2*, foi significativamente prevalente em pacientes com sobrevida baixa, particularmente em doentes sem metástase de nódulos linfáticos.

TWIST1, através de sua expressão aumentada, parece ainda regular negativamente a expressão de E-caderina paralelamente a uma expressão positiva de N-

caderina, prejudicando as junções de ligações célula-célula, e interferindo na homeostase epitelial (WEI *et al.*, 2016). Corroborando com isso, um estudo produzido por Yang *et al.* (2004) observaram uma correlação entre a perda da expressão das proteínas E-caderina e a superexpressão de *TWIST1*. Em contrapartida, outros marcadores fibroblásticos que estão diretamente ligados ao processo de TEM, como a N-caderina, mostravam-se positivamente induzidos.

WANG *et al.* (2013), investigando a expressão de Twist e E-caderina em tecidos de câncer de ovário e o processo de TEM na metástase, observaram um aumento abundante de Twist e uma diminuição da E-caderina em comparação com os tecidos ovarianos normais. Quando o gene *TWIST1* foi silenciado em linhagem celular de câncer de ovário, a expressão de E-caderina aumentou significativamente, sugerindo que a expressão de E-caderina é regulada negativamente pelo gene *TWIST1* em câncer de ovário, facilitando o processo de TEM.

HAO *et al.* (2012) observaram que o silenciamento de *TWIST1* resultou num aumento quádruplo no RNAm de E-caderina e numa diminuição de aproximadamente 85% nos níveis de RNAm de N-caderina. Em contraste, a superexpressão de Twist diminuiu dramaticamente a E-caderina e aumentou os níveis de N-caderina. Desta forma, este grupo de pesquisadores sugeriu que a expressão reduzida de E-caderina é um evento chave nos cânceres epiteliais e que Twist tem desempenhado um papel significativo na regulação dos perfis de expressão transcricional de N- e E-caderina.

Estudos recentes como o de ZHENG *et al.* (2015) forneceram evidências *in vitro* de que a sinalização de β -catenina é essencial para facilitar a invasão de células de CEO e sugeriram que *TWIST1*, através de sua expressão alterada, regula a sinalização de β -catenina neste tipo tumoral, propondo que este eixo de sinalização *TWIST1*/ β -catenina aumenta o potencial de invasividade celular, promovendo a progressão tumoral.

FINLAY *et al.* (2015) observaram a superexpressão do gene *TWIST1* em câncer metastático de mama. Seus experimentos demonstraram que o silenciamento de *TWIST1* provocou a diminuição da capacidade de migração e invasão celular, sugerindo que este gene é um potencial alvo terapêutico, clinicamente significativo para o tratamento de tumores sólidos metastáticos.

Similarmente, ZHANG *et al.* (2015) avaliaram o papel do gene *TWIST1* em câncer gástrico e os resultados mostraram que a expressão deste gene conferia resistência às células, além de promover um aumento da capacidade de proliferação e invasão das células.

DAI *et al.* (2012) investigaram a superexpressão de *TWIST1* e seu papel na invasividade tumoral em linhagem celular de CEO e observaram que houve expressão de uma fusão proteica estável de Myc/Twist na linhagem celular, localizada principalmente no núcleo. Também foi observado que *TWIST1* inibiu significativamente a atividade do promotor de E-caderina e aumentou a invasão celular.

Outro fator que também parece estar envolvido na expressão de *TWIST1* é o HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), o qual em condições estabilizadas de hipóxia regula positivamente diversos genes que promovem a sobrevivência celular, a metástase e a agressividade em condições de escassez de oxigênio. YANG *et al.* (2008) observaram que HIF-1 α promove TEM e fenótipos metastáticos em carcinoma de cabeça e pescoço, através de regulação positiva da expressão de *TWIST1*. A repressão de *TWIST1* inverte o processo de TEM e fenótipos metastáticos.

JOUPPILA-MÄTTÖ *et al.* (2011) observaram que em carcinoma de orofaringe a expressão *TWIST1* e *SNAIL* em células estromais está associada a características histopatológicas e clínicas que indicam doença progressiva. Por outro lado, a baixa expressão desses fatores de transcrição que promovem TEM prediz um melhor prognóstico. Além disso, eles constataram que os pacientes com expressão de *TWIST1* em células epiteliais apresentam um maior risco a desenvolver metástases linfonodais.

Sendo assim, a massiva demonstração na literatura de que a superexpressão do gene *TWIST1* está correlacionada com o desenvolvimento e a progressão de diversos tipos de câncer, sugere que a superexpressão deste gene observada nas amostras do presente trabalho (100% dos tecidos tumorais em relação ao tecido normal) pode ter exercido um papel importante no desenvolvimento do CEO nestes pacientes, independente do estadiamento.

No presente estudo foi avaliada a correlação entre a expressão do gene *TWIST1* e os dados clínico-patológicos (gênero, idade, tabagismo, etilismo, TNM, estadiamento). No entanto, não foi observada correlação estatisticamente significativa

destes com a expressão aumentada do gene. Para este fim, foram utilizados os testes de Qui-quadrado e exato de Fisher, através do programa estatístico Bioestat 5.3 e do programa SPSS versão 17.0.

No estudo de WUSHOU *et al.* (2012) propuseram em seu estudo que Twist pode servir como um marcador molecular útil para predizer risco de metástase linfonodal e mau prognóstico no CEO, pois a expressão de Twist foi positivamente associada com metástase e nódulos linfáticos, assim como com a recorrência do tumor.

ZHUO *et al.* (2014), em análise da associação da expressão de *TWIST1* com parâmetros clínico-patológicos de pacientes com carcinoma de nasofaringe, observaram que não foram encontradas associações entre a superexpressão do gene com idade e gênero, resultado coincidente com o presente estudo. Ademais, o estudo de ZHUO *et al.* (2014) encontrou associação marcadamente superior entre a expressão de *TWIST1* e metástases linfonodais e distantes quando comparados à pacientes sem metástases, confrontando com nossos achados.

No presente estudo, quando analisados os dados clínico-patológicos entre si, foi observado que o paciente etilista tem nove vezes mais risco de desenvolver metástase linfonodal em relação ao não etilista; $p= 0,02$, $OR= 9,1$ (IC 95% 1,493-56,295). Foi constatada uma tendência estatística para o fato de que o paciente etilista tem cinco vezes mais risco de invasão do tecido conjuntivo ou lâmina própria (T3-T4) em relação ao não etilista; $p= 0.061$, $OR= 5,2$ (IC 95% 1,068-25,309).

Foi observado por QILONG *et al.* (2016) uma redução significativa na sobrevida de três a cinco anos em etilistas com carcinoma de orofaringe sem metástase linfonodal. Para os etilistas, as taxas de sobrevivência de três a cinco anos foram de 43% e 36%, respectivamente, enquanto para os não etilistas os valores correspondentes foram 63% e 58%, respectivamente, demonstrando que o consumo de álcool foi um fator independente para a sobrevida dos pacientes.

Em CEO, o consumo de álcool está provavelmente relacionado ao efeito citotóxico local nas células que revestem os tecidos epiteliais da cavidade oral, da faringe e do esôfago que ficam expostos à agentes carcinogênicos (LÓPEZ-LÁZARO, 2016).

FORSYTH *et al.* (2010) comprovaram em seu trabalho a relação de progressão maligna e o álcool em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama e de

colón retal, promovendo a progressão de câncer e estimulando a TEM em células cancerígenas.

Por fim, em nossos dados, foi observada uma tendência estatística para o fato de que o paciente tabagista apresenta maior risco de desenvolver metástase linfonodal, em relação paciente não tabagista ($p= 0,058$).

Os achados de DANIEL *et al.* (1993) e DANIEL (1988) parecem estar de acordo com o presente estudo, pois foi observado em amostras de câncer de mama que os fumantes apresentavam maior frequência de metástases linfonodais em relação aos não-fumantes.

SINGH *et al.* (2015) constataram que a maior incidência de CEO foi no grupo com hábito de tabagismo e os sítios mais afetados foram a mucosa jugal, a língua e o sulco gengivo-jugal, devido à exposição direta ao tabaco e seus agentes cancerígenos.

MADANI *et al.* (2014) observaram em seu estudo com CEO que as taxas de consumo de tabaco foram significativamente maiores em indivíduos com câncer oral em relação ao grupo controle, concluindo que o câncer oral está etiológicamente relacionado ao hábito de fumar.

JUNG *et al.* (2016) e SIFAKI-PISTOLLA *et al.* (2017) em suas pesquisas, compararam o risco de desenvolver câncer de pulmão com o tabagismo, cujos resultados demonstraram um risco significativamente maior de morte por câncer de pulmão em fumantes quando comparados aos não fumantes e ex-fumantes.

Apesar de o tabaco ser um fator de risco mais forte do que o consumo de álcool, o aumento de consumo deste último, aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (ZHANG *et al.*, 2015).

Tal informação foi confirmada por ZYGOGIANNI *et al.* (2011) demonstraram que o uso concomitante de tabaco e álcool contribui para uma maior incidência de várias neoplasias malignas, especialmente carcinoma de cabeça e pescoço.

Por outro lado, JERJES *et al.* (2012) observaram que a redução nos hábitos de tabagismo e etilismo levou à uma redução significativa da mortalidade em três anos, mostrando que a prática crônica de fumar e beber está relacionada a um mau prognóstico em pacientes com câncer oral, levando a um aumento da mortalidade.

Dessa forma, o tabaco, através de seus componentes carcinogênicos e mutagênicos, parece interferir nas vias de sinalizações importantes para o CEO. O álcool por sua vez, pode atuar como fator sinérgico favorecendo a penetração dos agentes presentes no tabaco, através da agressão ao epitélio oral.

5. CONCLUSÃO

O gene *TWIST1* encontra-se superexpresso em CEO, embora não tenha sido encontrada significância estatística entre a superexpressão e os dados clínico-patológicos dos pacientes. No entanto, apesar da ausência de correlação estatística, estas características podem ter influenciado no início do processo neoplásico ou até mesmo estar influenciando na progressão deste tipo tumoral.

Os pacientes etilistas apresentam uma chance nove vezes maior de desenvolver metástase linfonodal e uma tendência estatística à invasão do tecido conjuntivo. Ademais, em pacientes tabagistas observou-se maior chance de desenvolvimento de metástase linfonodal.

Desta forma, o gene *TWIST1* assim como fatores etiológicos pesquisados demonstraram ser relevantes ao processo de carcinogênese em CEO.

6. REFERÊNCIAS

AKRAM, S.; MIRZA, T.; MIRZA, M. A. et al. Emerging Patterns in Clinico-pathological spectrum of Oral Cancers. **Pak J Med Sci.** **2013 May**, **29**(3):783-7.

ALAOUI-JAMALI , M. A.; SOARES, F.A.; CARRARO, D. M. et al. TWIST1 is a molecular marker for a poor prognosis in oral cancer and represents a potential therapeutic target. **Cancer** **2014 Feb** **1**;120(3):352-62. doi: 10.1002/cncr.28404. Epub 2013 Oct 21.

ALBERTS, B. et al., Biologia molecular da célula. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2010. 1396p.

AZAD, N.; MAURYA, M. K.; KAR, M. et al. Expression of GLUT-1 in oral squamous cell carcinoma in tobacco and non-tobacco users. **J Oral Biol Craniofac Res.** **2016 Jan-Apr**, **6** (1):24-30. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.006.

BESSENYEI, B.; OLÁH, E.; EGYETEM, D. et al. Clinical and Genetic Characteristics of Craniosynostosis. **Orv Hetil** **2014 Mar** **02**, **155** (9), 341-347. PubMed: 24566698 DOI: 10.1556/OH.2014.29821

BIALEK, P.; KERN, B.; YANG, X. et al. A *TWIST* code determines the onset of osteoblast differentiation. **Dev Cell** **2004**, **6**:423-435.

BRELAND, A.; COSTA, M. A.; EISSENBERG, T. Tobacco specific nitrosamines and potential reduced exposure products for smokers: a preliminary evaluation of Advance. **Tob Control.** **2003 Sep**, **12** (3): 317–321. doi: 10.1136/tc.12.3.317

BRENER ,S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia** **2007**, **53**(1): 63-69

CAO, Y.; GIOVANNUCCI, E. L. Alcohol as a Risk Factor for Cancer. **Semin Oncol Nurs.** **2016 Aug**, **32** (3):325-31. doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.012.

CONNERNEY, J.; ANDREEVA, V.; LESHEM, Y. et al. *TWIST1* dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. **Dev Dyn** 2006, **235**:1345-1357.

CONWAY, D. I.; PETTICREW, M.; MARLBOROUGH, H. et al. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Int J Cancer**. 2008, **122**:2811–2819.

DAI, W.; ZHANG, E. J.; DUAN, W. Y. et al. Overexpression of *TWIST1* promotes tumor invasion in human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**. 2012 Dec, **28** (12):1246-9.

DANIELL, H. W. Increased lymph node metastases at mastectomy for breast cancer associated with host obesity, cigarette smoking, age, and large tumor size. **Cancer**. 1988 Jul 15, **62**(2):429-35.

DANIELL, H. W.; TAM, E.; FILICE, A. Larger axillary metastases in obese women and smokers with breast cancer--an influence by host factors on early tumor behavior. **Breast Cancer Res Treat**. 1993, **25**(3):193-201.

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? **Curr Opin Cell Biol**. 2016 Dec, **43**:7-13. doi: 10.1016/

ECHARRI, M. J.; LOPEZ-MARTIN, A.; HITT, R. Targeted Therapy in Locally Advanced and Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LA-R/M HNSCC). **Cancers (Basel)**. 2016 Mar, **8**(3): 27. doi: 10.3390/cancers8030027

ERIKSSON, C. J. Genetic-epidemiological evidence for the role of acetaldehyde in cancers related to alcohol drinking. **Adv Exp Med Biol**. 2015, **815**:41-58. doi: 10.1007/978-3-319-09614-8_3.

FINLAY, J.; ROBERTS, C. M.; LOWE, G. et al. RNA-based *TWIST1* inhibition via dendrimer complex to reduce breast cancer cell metastasis. **Biomed Res Int**. 2015, **2015**:382745. doi: 10.1155/2015/382745. Epub 2015 Feb 11.

FORSYTH, C. B.; TANG, Y.; SHAIKH, M. et al. Alcohol Stimulates Activation of Snail, Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, and Biomarkers of Epithelial-mesenchymal Transition in Colon and Breast Cancer Cells. **Alcohol Clin Exp Res.** **2010 Jan**, **34** (1): 19–31. Published online 2009 Oct 23.

FRARE, J. C.; SAWAZAKI-CALONE, I.; AYROZA-RANGEL, A. L. et al. Histopathological grading systems analysis of oral squamous cell carcinomas of young patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** **2016 May 1**, **21**(3):e285-98.

GALE, N.; PILCH, B. Z.; SIDRANSKY, D. et al . Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. Epithelial Precursor Lesions. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours 2005. **IARC Press, Lyon, 2005**: Ch4; 177-179

GARCÍA-CARRACEDO, D.; VILLARONGA, M. A.; ÁLVAREZ-TEIJEIRO, S. et al. Impact of PI3K/AKT/mTOR pathway activation on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinomas. **Oncotarget.** **2016 May 17**, **7** (20): 29780–29793. doi: 10.18632/oncotarget.8957.

GARZINO-DEMO, P.; DELL'ACQUA, A.; DALMASSO, P. et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. **J Craniomaxillofac Surg.** **2006 Sep**, **34**(6):344-50. Epub 2006 Jul 21.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K. et al . Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **JAMA.** **2012**, **307** (7):693-703

GUNDUZ, I.; KONDYLLIS, A.; JACCARD, G. ET AL. Tobacco-specific N-nitrosamines NNN and NNK levels in cigarette brands between 2000 and 2014. **Regul Toxicol Pharmacol.** **2016 Apr**, **76**:113-20. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.01.012.

GUO, Y. H.; WANG, L. Q.; LI, B. ET AL. Wnt/ β -catenin pathway transactivates microRNA-150 that promotes EMT of colorectal cancer cells by suppressing CREB signaling. **Oncotarget.** **2016 Jul 5**, **7**(27):42513-42526. doi: 10.18632/oncotarget.9893.

HAO, L.; HA, J. R.; KUZEL, P. et al. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. **Br J Dermatol.** **2012 Jun, 166** (6):1184-97. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10824.

HECHT, S. S.; STEPANOV, I.; CARMELLA, S.G. Exposure and Metabolic Activation Biomarkers of Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamines. **Acc Chem Res.** **2016 Jan 19, 49**(1):106-14. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00472.

HEERBOTH, S.; HOUSMAN, G.; LEARY, M. et al. EMT and tumor metastasis. **Clin Transl Med.** **2015, 4**: 6. doi: 10.1186/s40169-015-0048-3

HILLY, O.; PILLAR, N.; STERN, S. ET AL. Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients. **Oncol Lett.** **2016 Sep, 12**(3):1729-1736. Epub 2016 Jul 20.

HO, H.; LEE, M.; HSUAN, S. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young patients: a matched-pair analysis. **Eur Arch Otorhinolaryngol** **2007, 265**(1):57-61.

HOMSTRUP, P. Can we prevent malignancy by treatment premalignant lesions? **Oral Oncology** **2009, 45**:549-550.

HU, L.; ZHANG, S.; DONG, X. et al. Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. **PLoS One.** **2013 Apr 23, 8** (4):e62171. doi: 10.1371/journal.pone.0062171.

HYNDMAN, I. J. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenviron.** **2016 Apr, 9** (1): 63–69. doi: 10.1007/s12307-016-0183-4.

JERJES, W.; UPILE, T.; RADHI, H. et al. The effect of tobacco and alcohol and their reduction/cessation on mortality in oral cancer patients: short communication. **Head Neck Oncol.** **2012, 4**: 6. doi: 10.1186/1758-3284-4-6

Jouppila-Mättö, A.; Närkiö-Mäkelä, M.; Soini, Y. et al. Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression. **Published online 2011 Aug 11**. doi: 10.1186/1471-2407-11-350. BMC Cancer. 2011; 11: 350

JUNG ; JEON ; JEE , 2016. The effect of smoking on lung cancer: ethnic differences and the smoking paradox. **Epidemiol Health**. 2016 Dec 20, 38:e2016060. doi: 10.4178/epih.e2016060. eCollection 2016.

JUREL, S. K.; GUPTA,D. S.; SINGH, R. D. et al. Genes and oral cancer. **Indian J Hum Genet**. 2014 Jan-Mar, 20(1): 4–9. doi: 10.4103/0971-6866.132745

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**. 2009 Jun 1, 119(6): 1420–1428.doi: 10.1172/JCI39104

KAWAHARA, R.; BOLLINGER, J. G.; RIVERA, C. et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. **Proteomics**. 2016 Jan, 16 (1):159-73. doi: 10.1002/pmic.201500224. Epub 2015 Dec 15.

KONG, Y. H.; SYED ZANARUDDIN, S. N.; LAU, S. H. et al. Co-Expression of TWIST1 and ZEB2 in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Poor Survival. **PLoS One**. 2015 Jul 27, 10 (7):e0134045. doi: 10.1371/journal.pone.0134045.

KONG, Y. H.; ZANARUDDIN, S. N. S.; LAU, S. H. et al. Co-Expression of *TWIST1* and ZEB2 in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Poor Survival. **PLoS One**. 2015, 10 (7): e0134045. doi: 10.1371/journal.pone.0134045

KRISHNA, A.; SINGH, S.; KUMAR, V. et al. Molecular concept in human oral cancer. **Natl J Maxillofac Surg**. 2015 Jan-Jun, 6(1): 9–15.doi: 10.4103/0975-5950.168235

KRISHNAN, N. M.; DHAS, K.; NAIR, J. et al. A Minimal DNA Methylation Signature in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Links Altered Methylation with Tumor Attributes. **Mol Cancer Res**. 2016 Sep, 14(9):805-19. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0395.

KUMAR, M.; NANAVATI, R.; MODI, T. G. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **J Cancer Res Ther.** 2016 Apr-Jun, 12 (2):458-63. doi: 10.4103/0973-1482.186696.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A local mechanism by which alcohol consumption causes cancer. **Oral Oncol.** 2016 Nov, 62 :149-152. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.10.001.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Understanding cancer: 15 questions and answers. 2016. **ResearchGate.** DOI: 10.13140/RG.2.1.4180.6323.

MADANI; DIKSHIT; BHADURI. et al., 2014. Interaction of Alcohol Use and Specific Types of Smoking on the Development of Oral Cancer. **Int J High Risk Behav Addict.** 2014 Mar, 3(1): e12120.doi: 10.5812/ijhrba.12120

MAIA, H. C. M.; 1 PINTO N. A. S.; PEREIRA, J. S. et al. Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. **Einstein (Sao Paulo).** 2016 Jan-Mar; 14 (1): 35–40. doi: 10.1590/S1679-45082016AO3578.

MARKOPOULOS, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. **Open Dent J.** 2012, 6:126-30. doi: 10.2174/1874210601206010126. Epub 2012 Aug 10.

MARTTILA, E.; UITTAMO, J.; RUSANEN, P. et al. Acetaldehyde production and microbial colonization in oral squamous cell carcinoma and oral lichenoid disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** 2013 Jul, 116(1):61-8. doi: 10.1016/j.oooo.2013.02.009. Epub 2013 Apr 23.

MARUR, S.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. H. et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncol.** 2010 Aug, 11(8):781-9. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.

MOLY, P. K.; COOLEY, J. R.; ZELTZER, S. L. et al. Gastrulation EMT Is Independent of P-Cadherin Downregulation. **PLoS One.** 2016 Apr 20, 11(4):e0153591. doi: 10.1371/journal.pone

MORAL, M.; PARAMIO, J.M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. **Histol Histopathol** 2008, 23(10): 1269-78.

MORENO-LÓPEZ, L. A.; ESPARZA-GÓMEZ, G. C.; GONZÁLEZ-NAVARRO, A. et al. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol.** 2000, 36 (2):170-4.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.** 2002 Jul-Aug, 52(4):195-215.

OGBUREKE, K. U. E.; NIKITAKIS, N. G.; WARBURTO, G. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol** 2007, 43(9):920-32.

Oral Candida colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. Alnuaimi, A. D.; Wiesenfeld, D.; O'Brien-Simpson, N. M. et al. **Oral Oncol.** 2015 Feb, 51(2):139-45. doi: 10.1016

PALLIER, K.; CESSOT, A.; CÔTÉ, J. F. et al. TWIST1 a New Determinant of Epithelial to Mesenchymal Transition in EGFR Mutated Lung Adenocarcinoma. Published online 2012 Jan 17. doi: 10.1371/journal.pone.0029954. **PLoS One.** 2012, 7 (1): e29954. PMID: PMC3260187

PENG, Q.; CHEN, H.; HUO, J. R. Alcohol consumption and corresponding factors: A novel perspective on the risk factors of esophageal cancer. **Oncol Lett.** 2016 May; 11 (5): 3231–3239. doi: 10.3892/ol.2016.4401

PIRINE, E.; SOINI, Y. A survey of zeb1, TWIST and claudin 1 and 4 expression during placental development and disease. **APMIS.** 2014, 122(6):530-8. doi: 10.1111/apm.12187.

QILONG, M.A.; LIU, W.; JIA, R. et al. Alcohol and survival in ESCC: Prediagnosis alcohol consumption and postoperative survival in lymph node-negative esophageal carcinoma patients. **Oncotarget.** 2016 Jun 21, 7(25): 38857–38863.

QIN, Q.; XU, Y.; HE, T. et al. Normal and disease-related biological functions of *TWIST1* and underlying molecular mechanisms. **Cell Res.** **2012**, **22**: 90–106. doi: 10.1038/cr.2011.144

REN, H.; DU, P.; GE, Z. et al. *TWIST1* and *BMI1* in Cancer Metastasis and Chemoresistance. *J Cancer*. 2016; 7(9): 1074–1080. **Published online 2016 May 25**. doi: 10.7150/jca.14031. PMCID: PMC4911874

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncol Lett.** **2014 Jul**, **8**(1):7-11

SASAHIRA, T.; KURIHARA, M.; NISHIGUCHI, Y. et al. NEDD 4 binding protein 2-like 1 promotes cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma. **Virchows Arch.** **2016 Aug**, **469**(2):163-72. doi: 10.1007/s00428-016-1955-4.

SEDGWICK, A. E.; D’SOUZA-SCHOREY, C. Wnt Signaling in Cell Motility and Invasion: Drawing Parallels between Development and Cancer. **Cancers (Basel).** **2016 Sep**, **8**(9): 80. Published online 2016 Aug 29. doi: 10.3390/cancers8090080.

SEITZ HK1, STICKEL F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nat Rev Cancer.** **2007 Aug**;7(8):599-612.

SEONG, E.; YUAN, L.; ARIKKATH, J. Cadherins and catenins in dendrite and synapse morphogenesis. **Cell Adh Migr.** **2015**, **9** (3):202-13. doi: 10.4161/19336918.2014.994919.

SIFAKI-PISTOLLA; LIONIS; GEORGOULIAS, 2017. Lung cancer and tobacco smoking in Crete, Greece: reflections from a population-based cancer registry from 1992 to 2013. **Tob Induc Dis.** **2017 Jan** **19**, 15:6. doi: 10.1186/s12971-017-0114-2.

SIMPSON, D. R.; MELL, L.K.; COHEN, E. E. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol.** **2015 Apr**, **51**(4):291-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.012.

SINGH, M. P.; KUMAR, V.; AGARWAL, A. et al. Clinico-epidemiological study of oral squamous cell carcinoma: A tertiary care centre study in North India. **J Oral Biol Craniofac Res.** **2016 Jan-Apr, 6** (1):31-4. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.11.002. Epub 2015 Dec 4. Surg Oral Med Oral Pathol. 1978;46:518-39.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. **Clinical implications of multicentric origin Cancer,** **1953, 6:**963-968.

SMITH, B. N.; BHOWMICK, N. A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. **J Clin Med.** **2016 Feb, 5**(2): 17. doi: 10.3390/jcm5020017

TAHIRI, Y.; BASTIDAS, N.; MCDONALD-MCGINN, D. M. et al. New Pattern of Sutural Synostosis Associated With TWIST Gene Mutation and Saethre-Chotzen Syndrome: Peace Sign Synostosis. **J Craniofac Surg.** **2015 Jul, 26**(5):1564-7. doi: 10.1097/SCS.0000000000001884.

TANABE, S.; AOYAGI, K.; YOKOZAKI, et al. Regulation of CTNNB1 signaling in gastric cancer and stem cells. **World J Gastrointest Oncol.** **2016 Aug 15, 8**(8): 592–598. Published online 2016 Aug 15. doi: 10.4251/wjgo.v8.i8.592.

TSENG, J. C.; CHEN, H. F.; WU, K. J. A *Twist* tale of cancer metastasis and tumor angiogenesis. **Histol Histopathol.** **2015 Nov, 30** (11):1283-94. doi: 10.14670/HH-11-638.

WALLERAND, H.; ROBERT, G.; PASTICIER, G. et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. **Urol Oncol.** **2010 Sep-Oct, 28**(5):473-9. doi: 10.1016/j.urolonc.2008.12.018.

WANG, B.; ZHANG, S.; YUE, K. et al. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. **Chin J Cancer.** **2013 Nov, 32** (11): 614–618.

WANG, W. S.; YU, S. L.; YANG, X. S. et al. Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues. **Asian Pac J Cancer Prev.** **2013, 14**(2):669-72.

WEI, L.; SUN, J. J.; CUI, Y. C. et al. Twist may be associated with invasion and metastasis of hypoxic NSCLC cells. **Tumour Biol.** **2016 Jul**, **37**(7):9979-87. doi: 10.1007/s13277-016-4896-2. Epub 2016 Jan 27.

WRIGHT, J.M. A review and update of oral precancerous lesions. *Texas Dent J* 1998; **115**(6): 15-9.

WU, C.; ZHUANG, Y.; JIANG, S. et al. Interaction between Wnt/ β -catenin pathway and microRNAs regulates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review). **Int J Oncol.** **2016 Jun**, **48** (6):2236-46. doi: 10.3892/ijo.2016.3480.

WUSHOU, A.; PAN, H.Y.; LIU, W. et al. Correlation of increased twist with lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg.** **2012 Jun**, **70** (6):1473-9. doi: 10.1016/j.joms.2011.06.212.

WYSS, A. B.; HASHIBE, M.; LEE, Y. A. et al. Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium. **Am J Epidemiol.** **2016 Oct** 15.

XU, Q.; KRAUSE, M.; SAMOYLENKO, A. et al. Wnt Signaling in Renal Cell Carcinoma. **Cancers (Basel).** **2016 Jun**; **8**(6): 57. Published online 2016 Jun 17. doi: 10.3390/cancers8060057.

XU, Y.; QIN, L.; SUN, T. et al. Twist1 promotes breast cancer invasion and metastasis by silencing Foxa1 expression. **Oncogene** **2016 Aug** 15. doi: 10.1038/onc.2016.286.

XUE, J.; YANG, S.; SENG, S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. **Cancers (Basel).** **2014 Jun**; **6**(2): 1138–1156. doi: 10.3390/cancers6021138

YALCIN, E.; DE LA MONTE, S. Tobacco nitrosamines as culprits in disease: mechanisms reviewed. **J Physiol Biochem.** **2016 Mar**, **72**(1):107-20. doi: 10.1007/s13105-016-0465-9.

YANG, J.; MANI, S. A.; DONAHER, J. L.; et al. *TWIST*, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell** **2004**, **117**:927-939.

YANG, M. H.; WU, M. Z.; CHIOU, S. H. et al. Direct regulation of *TWIST* by HIF-1 α promotes metastasis. **Nature Cell Biology** **10**, 295 - 305 (2008). doi:10.1038/ncb1691

ZHANG, H.; GONG, J.; KONG, D. et al. Anti-proliferation effects of *TWIST* gene silencing in gastric cancer SGC7901 cells. **World J Gastroenterol.** **2015 Mar 14**, **21**(10):2926-36. doi: 10.3748/wjg.v21.i10.2926.

ZHENG, L.; LI, N.; GUO, F. et al. *TWIST*-related protein 1 enhances oral tongue squamous cell carcinoma cell invasion through β -catenin signaling. **Mol Med Rep.** **2015 Mar**, **11** (3):2255-61. doi: 10.3892/mmr.2014.2904. Epub 2014 Nov 7.

ZHENG, X .; CARSTENS, J. L.; KIM, J. et al. EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. **Nature.** **2015 Nov 26**, **527** (7579): 525–530. doi: 10.1038/nature16064

ZHOU, Y.; ZHENG, J.; LI, S. et al. Alcoholic Beverage Consumption and Chronic Diseases. **Int J Environ Res Public Health.** **2016 May 24**, **13** (6). pii: E522. doi: 10.3390/ijerph13060522.

ZHUO, X.; CHANG, A.; HUANG, C. et al. Expression of *TWIST*, an inducer of epithelial-mesenchymal transition, in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. **Int J Clin Exp Pathol.** **2014**; **7** (12): 8862–8868.

ZYGOGIANNI, A. G.; KYRGIAS, G.; KARAKITSOS, P. et al. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head Neck Oncol.** **2011**, **3**:2. doi: 10.1186/1758-3284-3-2