



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ANDERSON BARROS ARCHANJO**

**ANÁLISE ELEMENTAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM O TABAGISMO,  
EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E SOBREVIVÊNCIA**

**Vitória/ES**

**2018**

**ANDERSON BARROS ARCHANJO**

**ANÁLISE ELEMENTAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM O TABAGISMO,  
EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E SOBREVIVÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto focal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva

Coorientador: Christiano Jorge Gomes Pinheiro

**Vitória/ES**

**2018**

# TERMO DE APROVAÇÃO

**ANDERSON BARROS ARCHANJO**

## **ANÁLISE ELEMENTAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM O TABAGISMO, EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E SOBREVIVÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto focal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 25 de Setembro de 2018.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Madeira Álvares da Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)  
RENORBIO  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Christiano Jorge Gomes Pinheiro  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Coorientador)

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)  
RENORBIO  
(Examinadora Interna)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flavia Imbroisi Valle Errera  
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de  
Misericórdia de Vitória  
(Examinadora Interna)

---

Prof. Dr. Marcelo dos Santos  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte  
(Examinador Externo)

---

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(UFES)  
(Examinador Externo)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua imensa bondade, a minha eterna gratidão pelas bênçãos e conquistas.

Aos pacientes, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

A minha amada Mãe, Ducélia, por todo amor, carinho, confiança e incentivo. Minha eterna gratidão.

A minha família, em especial a minha avó Luiza e minha tia Brígida, por todo amor e preocupação.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Madeira Álvares da Silva, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Christiano Jorge Gomes Pinheiro, pela ajuda nas análises elementares e demais momentos.

Ao professor e amigo Dr. Leonardo Oliveira Trivilin, pelo incentivo para o ingresso ao doutorado e a todos os conselhos e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Marcelo dos Santos, pela colaboração e conselhos na análise estatística.

A Prof. Dr.<sup>a</sup> Edna Teruko Kimura, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular da Glândula Tiroide, para a confecção dos *tissue microarrays* e a Dr.<sup>a</sup> Kelly Cristina Saito pelo auxílio na parte técnica.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, pela disponibilização do Laboratório de Patologia Cirúrgica, para preparo das amostras.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eloíza Helena Tajara, coordenadora do projeto do Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, pela disponibilização do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, para realização das análises.

Ao Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, em especial ao biomédico Rafael de Souza e aos médicos Rafael de Cicco, Pablo Gabriel Ocampo Quintana, Marcos Dias Nunes de Moraes Andrea Martins Vieira Friaça, por todo empenho e dedicação para a disponibilização das amostras.

Aos companheiros de doutorado, Juliana, Júlia, Joaquim, Cinthia, por toda a ajuda e incentivo. Em especial a Aline Borçoi, Flávia Freitas e Lucas Maia pelas valiosas dicas para análise estatística e a Suzanny Mendes pela colaboração nas análises elementares e imuno-histoquímica.

Aos guerreiros da estrada, Aline, Érika e Flávia pelas inúmeras idas e vindas para as disciplinas em Vitória.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, em especial a Juliana Krüger, Juliana Dalbó e Mayara Mota, pela ajuda e as conversas fiadas.

Ao Laboratório de Patologia Animal, em especial as professoras Dr.<sup>a</sup> Louisiane de Carvalho Nunes, Dr.<sup>a</sup> Jankerle Neves Boeloni e Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida da Silva, pela disponibilização do laboratório e as dicas e colaboração nas análises.

Aos colegas de república, Adelson e Clever, por terem me aturado nos momentos em que eu não estava de bom humor.

A minha grande amiga e companheira de doutorado, Arícia, por todos os momentos durante os experimentos, viagens, festas e discussões. E principalmente por aturar meu humor não muito estável.

Ao meu grande amigo Rômulo, por sempre me incentivar e estar ao meu lado nos momentos difíceis e por suportar meu estresse, quase sempre diário.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em especial ao Dr. Carlos Alberto Perez, pela oportunidade de realização da análise elementar.

A Universidade Federal do Espírito Santo, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Rede Nordeste de Biotecnologia, pela oportunidade formação nesse conceituado curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo, pela concessão da bolsa e pelo fomento financeiro, sem o qual seria mais difícil a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram ao longo da caminhada e aqueles que injustamente não citei, mas estão no meu coração.

**MUITO OBRIGADO!!!**

*“Você nunca será bom o suficiente  
para todos, mas sempre será perfeito  
para aquela pessoa que te merece”.*

*Autor desconhecido.*

## RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço é um tipo tumoral altamente maligno e agressivo que apresenta uma taxa elevada de morbidade e mortalidade, acometendo principalmente a cavidade oral, a laringe e a faringe. A correlação entre os elementos traços e o processo de carcinogênese, deve-se ao potencial citotóxico de alguns destes quando disponíveis em concentrações excedentes. Somado a este, estudos recentes descreveram a associação destes elementos com a regulação de vias relacionadas a progressão tumoral e com o prognóstico a ser observado, dentre essas vias está a via da hipóxia que tem o seu principal regulador a HIF1. Assim, este trabalho avaliou a caracterização elementar em amostras de carcinoma células escamosas da cavidade oral, bem como a associação do uso do tabaco no perfil elementar e a relação com o prognóstico e sobrevida dos pacientes. Além disso, avaliou a expressão das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3 e sua relação com os hábitos tabagista e etilista, assim como a expressão dessas proteínas à presença de elementos químicos nas mesmas amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral. Para isso, foram obtidas 78 amostras de tecido tumoral de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cavidade oral, tratados no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho e acompanhados por pelo menos 24 meses a partir do tratamento inicial. As amostras foram categorizadas de acordo com os hábitos tabagista e etilista. Foram confeccionados *tissue microarrays* para a caracterização elementar por meio da técnica de  $\mu$ -XRF baseada em radiação síncrotron, bem como para a análise da expressão dos proteínas HIF-1 $\alpha$  e PHD3. Para os testes de associação foram utilizados o teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. A regressão logística multivariada por modelagem foi utilizada para ajustar os valores do *odds ratio* e o intervalo de confiança. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier e o valor de p de Wilcoxon e modelo Cox Proportional Hazards foi utilizado para o ajuste dos valores de *hazards ratio* e o intervalo de confiança. Os seguintes elementos foram detectados: magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, cromo, manganês, ferro, zinco, cobalto, níquel, cobre, arsênio e bromo. Em relação ao prognóstico, o magnésio esteve relacionado à sobrevida livre de doença e o cloro e cromo com recidiva, mostrando-se um fator protetor contra a ocorrência de recidiva e para uma melhor sobrevida livre de doença. Foi verificada a expressão nuclear de HIF-1 $\alpha$  em 68 amostras e de HIF-1 $\alpha$  citoplasmática em 71 amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral. A expressão nuclear de PHD3 foi observada em 49 amostras e de PHD3 citoplasmática em 48 amostras. Foi verificada ainda a relação do tamanho tumoral com a intensidade de marcação da HIF-1 $\alpha$  nuclear e positividade da expressão de PHD3 citoplasmática com o estadio clínico avançado. Verificou-se também que o tumores T3/T4 e a presença de cloro aumentam as chances de apresentarem expressão forte de HIF-1 $\alpha$  citoplasmática e que o estadio clínico, o consumo atual de álcool e a presença do elemento cromo influenciam na expressão da PHD3. Para as sobrevidas, foi observado a associação da sobrevida livre de doença com o *status* linfonodal, ao passo que a sobrevida doença-específica foi associada ao *status* linfonodal e ao estadio clínico avançado. Com o presente trabalho foi possível caracterizar as amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral quanto à presença dos elementos magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, cromo, manganês, ferro, zinco, cobalto, níquel, cobre, arsênio e bromo, dos quais os elementos magnésio, cloro, cromo, manganês, níquel, arsênio e bromo estiveram associados ao tabagismo. Além disto, os elementos cloro e

cromo estiveram associados com o prognóstico, no qual o elemento cloro foi apontado como fator independente de proteção para a recidiva e para uma melhor sobrevida livre de doença. O elemento cromo, o estadió clínico avançado e o consumo de álcool influenciaram a intensidade expressão da proteína PHD3 e o elemento cloro e o tamanho tumoral a expressão da proteína HIF-1 $\alpha$ . Esse estudo apresenta dados inéditos sobre o perfil elementar, os hábitos e a expressão de HIF-1 $\alpha$  e PHD3 com os fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas; câncer bucal; cloro; HIF-1 $\alpha$ ; PHD3; perfil elementar.

## ABSTRACT

Head and neck cancer is a highly malignant and aggressive tumor type that presents a high rate of morbidity and mortality, mainly affecting the oral cavity, larynx and pharynx. The correlation between trace elements and the carcinogenesis process is due to the cytotoxic potential of some of these when available in excess concentrations. In addition to this, recent studies have described the association of these elements with the regulation of pathways related to tumor progression and the prognosis to be observed, among these pathways is the hypoxia pathway that has its main regulator HIF1. Thus, this work evaluated the elementary characterization in squamous cell carcinoma samples of the oral cavity, as well as the association of tobacco use in the elemental profile and the relation with the prognosis and survival of the patients. In addition, it evaluated the expression of the HIF1- $\alpha$  and PHD3 proteins and their relation to the smoking and alcohol habits, as well as the expression of these proteins to the presence of chemical elements in the same samples of squamous cell carcinoma of the oral cavity. For this, 78 samples of tumor tissue were obtained from patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the oral cavity treated at the Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute and followed up for at least 24 months from initial treatment. The samples were categorized according to the smoking and alcohol habits. Tissue microarrays were made for elementary characterization using the synchrotron radiation-based  $\mu$ -XRF technique, as well as for the analysis of the expression of HIF-1 $\alpha$  and PHD3 proteins. The Chi-square test and the Fisher exact test were used for the association tests. Multivariate logistic regression by modeling was used to adjust odds ratios and confidence intervals. Survival curves were evaluated according to the Kaplan-Meier model and the Wilcoxon p-value and Cox Proportional Hazards model were used to adjust the hazards ratio values and the confidence interval. The following elements were detected: magnesium, phosphorus, sulfur, chlorine, potassium, calcium, chromium, manganese, iron, zinc, cobalt, nickel, copper, arsenic and bromine. Regarding the prognosis, magnesium was related to disease-free survival and chlorine and chromium with relapse, showing a protective factor against the occurrence of relapse and better disease-free survival. Nuclear HIF-1 $\alpha$  expression was verified in 68 samples and cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  in 71 samples of oral cavity squamous cell carcinoma. Nuclear expression of PHD3 was observed in 49 samples and of cytoplasmic PHD3 in 48 samples. It was also verified the relation of the tumor size with the intensity of nuclear HIF-1 $\alpha$  labeling and the positivity of the cytoplasmic PHD3 expression with the advanced clinical stage. It has also been shown that T3 / T4 tumors and the presence of chlorine increase the chances of presenting strong expression of cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  and that the clinical stage, the current consumption of alcohol and the presence of the chromium element influence the expression of PHD3. For survival, the association of disease-free survival with lymph node status was observed, while disease-specific survival was associated with lymph node status and advanced clinical stage. The present work was able to characterize oral squamous cell carcinoma samples for the presence of magnesium, phosphorus, sulfur, chlorine, potassium, calcium, chromium, manganese, iron, zinc, cobalt, nickel, copper, arsenic and bromine, of which the elements magnesium, chlorine, chromium, manganese, nickel, arsenic and bromine were associated with smoking. In addition, the chlorine and chromium elements were associated with the prognosis, in which the chlorine element was identified as an independent protective factor for recurrence

and for better disease-free survival. Chromium, advanced clinical stage and alcohol consumption influenced the expression intensity of the PHD3 protein and the chlorine element and the tumor size of HIF-1 $\alpha$  protein expression. This study presents unpublished data on the elemental profile, habits and expression of HIF-1 $\alpha$  and PHD3 with the prognostic factors and survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma; oral cancer; chlorine; HIF-1 $\alpha$ ; PHD3; elementary profile.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
Epidemiologia e fatores de risco do câncer de cavidade oral .....	15
Fatores prognósticos .....	17
Relação da HIF-1 $\alpha$ e PHD3 na hipóxia e no câncer oral .....	19
Elementos químicos e câncer .....	21
<b>CAPÍTULO 1: ELEMENTAL CHARACTERIZATION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS AND SURVIVAL</b> .....	<b>24</b>
Abstract .....	26
Introduction .....	27
Material and methods .....	28
<i>Ethics</i> .....	28
<i>Samples</i> .....	28
<i>Tissue microarrays</i> .....	29
<i>Elementary characterization</i> .....	30
<i>Statistical Analysis</i> .....	30
<b>Results</b> .....	<b>31</b>
<i>Smoking and elementary characterization</i> .....	31
<i>Epidemiological and prognostic factors in oral cancer</i> .....	31
<i>Elements and prognosis in oral cancer</i> .....	36
<b>Discussion and conclusions</b> .....	<b>36</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>39</b>
<b>References</b> .....	<b>39</b>

Supplementary table 1. Elemental characterization of oral cavity squamous cell carcinoma samples according to patients' smoking habits.....	44
Supplementary table 2. Elemental characterization versus prognostic characteristics.....	46
<b>CAPÍTULO 2: CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO ENTRE HIF-1<math>\alpha</math>, PHD3, PERFIL ELEMENTAR QUÍMICO, PROGNÓSTICO E SOBREVIDA.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>48</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<i>Casuística e amostras .....</i>	<i>51</i>
<i>Tissue microarrays .....</i>	<i>52</i>
<i>Caracterização elementar.....</i>	<i>53</i>
<i>Reação de imuno-histoquímica .....</i>	<i>53</i>
<i>Avaliação da expressão por microscopia ótica .....</i>	<i>54</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>55</i>
<i>Aspectos éticos.....</i>	<i>56</i>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<i>Expressão das proteínas .....</i>	<i>56</i>
<i>Características clínicopatológicas e o padrão de expressão .....</i>	<i>58</i>
<i>Características prognósticas.....</i>	<i>61</i>
<i>Sobrevida.....</i>	<i>62</i>
<i>Elementos versus expressão de HIF1-<math>\alpha</math> e PHD3 .....</i>	<i>66</i>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>80</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO 1. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do CCS/UFES.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 2. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do ICAVC.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 3. Comprovante de submissão de artigo 1 .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 4. Comprovante de publicação de artigo 2 .....</b>	<b>103</b>

## INTRODUÇÃO

Na atualidade, o câncer é um grande problema na saúde pública mundial (SIEGEL et al., 2017). Dentre os diversos tipos tumorais frequentes na população mundial, o carcinoma de cabeça e pescoço é um tipo altamente maligno e agressivo e apresenta uma elevada taxa de morbidade e mortalidade (JOU; HESS 2017). No Brasil, a Organização Mundial de Saúde, estimou para o ano de 2018, 10.457 casos novos de câncer da cavidade oral nos homens e 4.316 em mulheres, o que correspondem a uma prevalência estimada de 18,9 novos casos a cada 100 mil homens e 8,1 a cada 100 mil mulheres (World Health Organization, 2018).

Entre as principais localizações anatômicas do câncer de cabeça e pescoço, os que acometem a cavidade oral correspondem a cerca de 40%, os de laringe a 25% e os de faringe a 15% (DÖBRÖSSY, 2005).

O carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide é a principal variante histológica e corresponde a cerca de 90% dos casos de tumores da cavidade oral, faringe e laringe (LEEMANS et al, 2011; PFISTER et al, 2017). É um tipo tumoral com etiologia complexa e multifatorial, atingindo principalmente indivíduos com faixa etária entre 50 e 70 anos e que possuam histórico de consumo de tabaco e álcool, além de suscetibilidade genética e infecção por HPV, nos casos de câncer de orofaringe (GILLISON et al., 2007; HAN et al., 2010; LEEMANS et al., 2011; PFISTER et al., 2017).

O consumo, individual ou combinado, de tabaco e álcool são apontados como os principais fatores associados ao risco de câncer oral (FERREIRA; ROCHA, 2010). Sozinha a fumaça do tabaco, que contém centenas de moléculas cancerígenas conhecidas (SINGH et al., 2011), são capazes de atuar provocando uma provável indução de danos ao DNA o que levaria ao aumento das mutações e uma maior suscetibilidade a mutações em genes relacionados ao câncer (HECH, 2003). Quando associado o consumo de álcool e tabaco, os dois atuam sinergicamente e aumentam em 65% o risco de se desenvolver o câncer de cavidade oral (INCA, 2015).

Especificamente, em tumores de cabeça e pescoço, o consumo de 50 g/dia de álcool aumenta em até três vezes o risco do desenvolvimento quando comparado

aos não consumidores de bebidas alcoólicas (BAAN et al., 2007). É importante ressaltar ainda que a amplitude do risco para tumores de cabeça e pescoço é devido a interação entre o consumo de álcool e o tabagismo, onde os riscos são multiplicados (SZYMANSKA et al., 2011).

A presença de elementos químicos, metais ou não, em tumores está associada a progressão e possível prognóstico. Em tumores de mama diversos trabalhos reportaram o papel de elementos na gênese e progressão desta neoplasia. Majewska et al., (1997), por exemplo, relatam diferenças nas concentrações dos elementos P, S, K, Ca, Mn, Fe, Se e Rb, quando comparados tumores benignos e malignos. Silva et al., (2012) relataram que a quantificação de elementos traços é um potencial marcador em tumores mamários e destacam que pacientes com a presença do elemento cromo apresentaram uma menor sobrevida. Geraki et al., (2004), destacam que as concentrações dos elementos potássio e zinco foram maiores em tumores da mama em comparação a tecido mamário normal.

Alguns metais podem interferir com a atividade de proteínas Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependente, uma classe de proteínas que possui no seu sítio catalítico um átomo de ferro +2. A literatura nos traz que, o ferro pode ser substituído na presença de metais que possuem maior afinidade com o núcleo catalítico, fazendo a perda de função enzimática. Entre as proteínas Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependente está a PHD3 uma prolil hidroxilase reguladora da HIF1 (hypoxia-inducible factor-1), que é a proteína mais importante da via de hipóxia, controlando a expressão gênica de mais de 100 genes (SEMENZA, 2003; POLLARD et al., 2008).

Diante do exposto, este trabalho avaliou a caracterização elementar em amostras de carcinoma células escamosas da cavidade oral, bem como verificou a associação do uso do tabaco no perfil elementar para relação com o prognóstico e a sobrevidas dos pacientes. Além disso, o presente trabalho avaliou a expressão das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3 e sua relação com os hábitos tabagista e etilista, assim como relacionou a expressão dessas proteínas à presença de elementos químicos nas mesmas amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral.

## REVISÃO DE LITERATURA

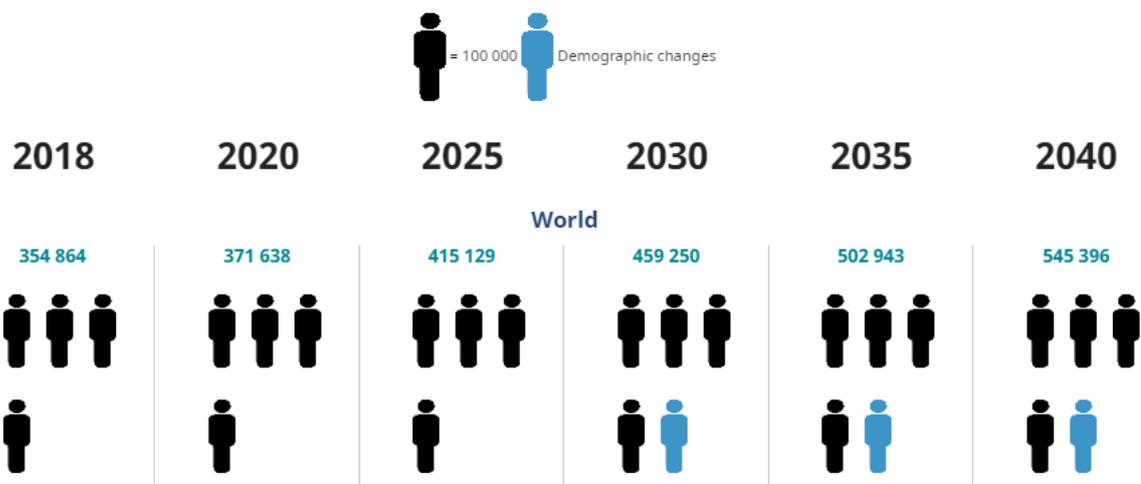
### Epidemiologia e fatores de risco do câncer de cavidade oral

O câncer é um importante problema de saúde pública em todo o mundo (SIEGEL et al., 2017). Para o ano de 2018 a incidência mundial estimada é de 18 milhões de casos e 9,5 milhões de mortes por câncer. No Brasil, em 2018, foi estimado a ocorrência de novos casos de câncer de cavidade oral em 10.457 homens e 4.316 mulheres. É o nono mais frequente em homens e o décimo sétimo em mulheres, no país. A prevalência em 5 anos é de 18,9 a cada 100 mil homens e 8,1 a cada 100 mil mulheres (World Health Organization, 2018).

Dentre os diversos tipos de tumores que acometem a população mundial, o câncer de cabeça e pescoço, uma denominação coletiva baseado em definições anatômicas e topográficas para descrever tumores malignos do trato aero digestivo superior, que compreende a cavidade bucal, a faringe e a laringe (DÖBRÖSSY, 2005), é um tipo altamente maligno e agressivo com elevado perfil de morbidade e mortalidade (JOU; HESS, 2017).

Um dos principais subgrupos de carcinomas de cabeça e pescoço é o câncer oral, que envolve a mucosa da boca (lábios, base da língua, língua, assoalho da boca e palato duro) e faringe (orofaringe, hipofaringe e nasofaringe). Aproximadamente 40% dos tumores de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% ocorrem na faringe, 25% ocorrem na laringe (DÖBRÖSSY, 2005).

Esses tumores respondem por 354.864 mil casos em 2018, com os dois terços ocorrendo em homens. Em todo o mundo, estima-se 177.384 mil mortes (World Health Organization, 2018). Na figura 1, pode-se observar a estimativa crescente de novos casos de câncer oral até o ano de 2040 em todo o mundo.



**Figura 1.** Número estimado incidência mundial de casos de câncer de lábio e cavidade oral, em ambos os sexos e todas as idades, de 2018 a 2040. Fonte: GLOBOCAN 2018 - International Agency for Research on Cancer 2018 (<http://gco.iarc.fr/>).

Das diversas variantes histológicas, o carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide representa mais de 90% dos casos de tumores da cavidade oral, faringe e laringe (LEEMANS et al., 2011; PFISTER et al., 2017). Historicamente, acomete principalmente indivíduos entre a quinta e sétima décadas de vida com o hábito de consumo de tabaco e álcool, também pode ser decorrente de infecção por HPV e suscetibilidade genética (GILLISON et al., 2007; HAN et al., 2010; LEEMANS et al., 2011; PFISTER et al., 2017). Vale ressaltar que estudos epidemiológicos identificaram uma incidência crescente de carcinoma de células escamosas de cavidade oral entre indivíduos brancos com menos de 45 anos (PATEL et al., 2011; LIU et al., 2016).

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de produtos químicos, dentre os quais pelo menos 60 causam câncer, pela provável indução de danos ao DNA, o que levaria a um incremento da carga de mutações somáticas e uma maior possibilidade de adquirir mutações genes relacionados ao câncer (HECHT, 2003).

A avaliação do genoma de tumores associados ao tabagismo permite a reavaliação da compreensão atual da fumaça do tabaco como fator de risco para o câncer de cavidade oral, devido a uma assinatura mutacional distinta que a mesma imprime nos genomas (ALEXANDROV; STRATTON, 2014).

Essa compreensão é possível, pois o genoma de uma célula tumoral carrega mutações somáticas que são consequências cumulativas dos processos de danos e reparação do DNA e as ações globais de sequenciamento fornecem um acervo de milhares de mutações somáticas de tumores distintos, proporcionando, assim, uma oportunidade para se decifrar as assinaturas de processos mutacionais no câncer humano (JOU; HESS, 2017).

Além disto, os efeitos indiretos do tabagismo devem ser considerados, seja eventos epigenéticos ou eventos relacionados ao sistema imunológico tais como a inflamação e/ou distúrbios metabólicos (PICKERING et al., 2014; ALEXANDROV et al., 2016).

O risco conferido pelo consumo de álcool é significativo e aumenta em três vezes a possibilidade de câncer de cavidade oral e faringe e cerca de duas vezes o risco de câncer de laringe e o consumo combinado entre o cigarro e a bebida potencializa os seus efeitos individuais (SAPKOTA et al., 2008). Lee et al., (2008), incluem o tabagismo passivo como fator de risco. A baixa ingestão de frutas e vegetais é ainda descrito como fatores associados ao surgimento destes tipos tumorais (SAPKOTA et al., 2008).

Nas últimas décadas, a incidência geral de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) vem diminuindo nos Estados Unidos, Europa e Austrália, enquanto a incidência de câncer de células escamosas orofaríngea (CCEO) vem aumentando (CHATURVEDI et al., 2011). Essas tendências são atribuíveis a um declínio no uso do tabaco e à associação de cepas de alto risco de papilomavírus humano (hr-HPV), em particular HPV16, com CCEO. A infecção por HPV16 é aceita como um fator de risco independente para o CCEO e o *status* do HPV é o marcador prognóstico (ANG et al., 2010; GILLISON et al., 2015).

### **Fatores prognósticos**

Os fatores prognósticos são de grande relevância em diversas doenças, pois por meio deles é possível traçar um melhor caminho para o tratamento. No câncer de cabeça e pescoço isso não é diferente, pois importantes fatores prognósticos como a positividade para o vírus do papiloma humano (HPV), o sítio e o estágio TMN, as

comorbidades e os marcadores moleculares direcionam qual a terapia a ser utilizada nos pacientes com grupos de características comuns (*van den BREKEL et al., 2002; MEHANNA et al., 2010*).

Para o câncer de cabeça e pescoço a expectativa de sobrevivência é distinta para cada sítio. Pacientes com tumores nos lábios apresentam taxa de sobrevida de 93%, na cavidade oral é de 51%, enquanto na hipofaringe é de apenas 19%. Pacientes que apresentam tumores maiores e com disseminação nodal tem uma taxa de sobrevida baixa (*MEHANNA et al., 2010*). A idade e o estadio avançado, e o elevado consumo de álcool são preditores desfavoráveis para a sobrevida desse tipo de tumor. A duração do consumo de tabaco, antes do tumor primário, é ainda fator de risco para o surgimento de tumores secundários (*LEONCINI et al., 2015*).

Várias características prognósticas relacionadas ao tumor e aos pacientes estão descritas, contudo existe pouca informação disponível de como superar os riscos e direcionar a modalidade terapêutica. Assim, na prática clínica o estadio TNM e a presença ou ausência de doença extranodal estão incluídas no processo de tomada de decisão (*WENDT; BANK, 2002*).

Pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço com *status* positivo para HPV apresentam uma melhor taxa de sobrevida, especialmente para os casos de câncer orofaríngeos (*CALIFANO et al., 1996; GILLISON et al., 2000*). Essa positividade, em pacientes com câncer primário, está associada a uma sobrevivência maior e a um menor risco de recidiva tumoral, com taxa global de sobrevida de 88% (*AXELSSON et al., 2017*).

Além dos parâmetros prognósticos clássicos TNM, crescimento extranodal, volume tumoral, carga de linfonodos, extensão da necrose tumoral, classificação histológica, a hipóxia no tumor tem valor prognóstico, e as estratégias para superar o efeito adverso são investigadas (*WENDT; BANK, 2002*).

Santos et al., (2012), sugeriram que a expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) seja utilizada como marcador, pois podem auxiliar na decisão de radioterapia pós-operatória e no estabelecimento de prognóstico. Esses autores relataram que uma baixa expressão de HIF-1 $\alpha$  pode indicar a necessidade de margens cirúrgicas mais extensas. Mendes et al., (2014), também sugerem que a avaliação da expressão de HIF-1 $\alpha$  no infiltrado inflamatório possa ser usada como

marcador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral (MENDES et al., 2014).

As prolin hidroxilases (PHDs) são dioxigenases Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependente e são as principais reguladoras da atividade de HIF-1 $\alpha$  (SEMENZA, 2003; POLLARD et al., 2008). Högel et al (2013) demonstraram que o aumento da expressão de PHD3 sob hipóxia aumenta a progressão do ciclo celular e a sobrevivência do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Por outro lado, Liu et al., (2013) destacaram que a PHD3 desempenha papéis significativos na supressão do crescimento, angiogênese, diferenciação e metástase e promoção da apoptose de tumores em condições hipóxicas, podendo tornar-se uma ferramenta para novas abordagens na investigação tumoral.

Além dos biomarcadores descritos acima, outros ainda são associados a um prognóstico diferenciado em câncer de cabeça e pescoço. Do mesmo modo, o sítio específico da doença tem efeito significativo na expressão de biomarcadores (ZHANG et al., 2017).

A compreensão dos diversos fatores que contribuem para o prognóstico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, permite uma avaliação precisa do risco e promove o desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento. Além disso, surgem novas terapias específicas, que permitem aos clínicos diminuir o risco associado a fatores moleculares adversos (KIM et al., 2013).

### **Relação da HIF-1 $\alpha$ e PHD3 na hipóxia e no câncer oral**

As células de mamíferos podem encontrar situações de hipóxia. Para adaptar-se e sobreviver a essa condição, as células desenvolvem mecanismos que envolvem a ativação/estabilização de reguladores transcricionais. Esses mecanismos são mediados por vários sistemas que incluem os co-reguladores da transcrição, os complexos modificadores de cromatina, as enzimas de modificação de histonas e as alterações na metilação do DNA (TSAI; WU, 2014).

Em células tumorais a hipóxia é uma característica fundamental em muitos microambientes. O perfil da transcrição de genes em resposta à hipóxia pode estratificar os pacientes em termos de prognóstico, prever o benefício das terapias

modificadoras da hipóxia e aumentar a compreensão das complexidades da sua biologia (HARRIS et al., 2015).

Essas observações sugerem a existência de mecanismos de *feedback* dinâmico entre os fatores que geram respostas favoráveis à sobrevivência do tumor. O estudo e conhecimento dos mecanismos de modificação da cromatina local e global em resposta a alterações no microambiente do tumor hipóxico podem trazer novos rumos para a terapia de pacientes com câncer (PRICKAERTS et al., 2016).

O fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) desempenha um papel fundamental na reprogramação do metabolismo do câncer auxiliando na promoção da progressão tumoral (SEMENZA, 2010). O complexo HIF-1 é um heterodímero composto de subunidades alfa e beta e sua atividade é dependente da disponibilidade da subunidade alfa. Em condições de normóxia, HIF-1 $\alpha$  é constantemente sintetizada, porém sofre modificação pós-traducional pelas prolin hidroxilases (PHDs). A hidroxilação de prolina em HIF-1 $\alpha$  resulta na ligação da proteína von Hippel-Lindau e consequente ubiquitinação e degradação proteossomal da mesma (KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

Em condições de hipóxia, a atividade das PHDs são inibidas pela baixa disponibilidade de oxigênio, uma vez que elas são dioxigenases Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependente e sua atividade têm como requisito obrigatório o di-oxigênio como co-substrato (SEMENZA, 2003; POLLARD et al., 2008). Com essa inibição, a subunidade HIF-1 $\alpha$  fica estável e ativa, a qual se desloca para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF-1 $\beta$ , e associa-se com co-ativadores transcricionais induzindo a transcrição de genes envolvidos em processos como metabolismo celular, crescimento e apoptose, entre outros protagonistas da adaptação à baixa oxigenação (SEMENZA, 2003).

A via da HIF-1 regula uma maciça cascata de transcrição operacional em praticamente todas as células de animais e traduz uma ampla gama de respostas à hipóxia. As principais respostas desencadeadas estão relacionadas pela expressão de componentes da matriz celular, fatores de crescimento e citocinas, enzimas metabólicas, fatores de transcrição, reguladores epigenéticos, reguladores de sobrevivência e diferenciação celular, entre outros (BISHOP; RATCLIFFE, 2014).

Em revisão sistemática, Swartz et al. (2015), apontaram que HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , CA-IX (Carbonic anhydrase IX), GLUT-1 (GlucoseTransporter 1) e OPN (Osteopontin) como os biomarcadores mais estudados em hipóxia tumoral. Relatam ainda, que a expressão desses biomarcadores foi associada a uma pior sobrevida, quase que independente da terapia utilizada.

Mendes et al. (2014), verificaram que fraca expressão de HIF-1 $\alpha$  no infiltrado inflamatório das margens tumorais e no tumor aumentaram a recidiva e o risco de morte em 30%, em comparação com a forte expressão nas margens do tumor, definindo um alto risco independente de qualquer outro fator.

Santos et al., (2012), relataram que a expressão fraca de HIF-1 $\alpha$  é um marcador independente para recidiva local, representando um risco aumentado superior a 7 vezes em relação à expressão forte, o que leva esses autores a sugerir a utilização da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  como marcador para avaliar melhor as opções terapêuticas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Alguns elementos químicos podem interferir com a atividade de proteínas e assim modificar a expressão das mesmas. Por exemplo, o ferro pode ser substituído por outros elementos de maior afinidade com o núcleo catalítico, fazendo a perda de função enzimática (SEMENZA, 2003; POLLARD et al., 2008).

## **Elementos químicos e câncer**

A Organização Mundial da Saúde (OMS), agrupou os elementos traços em 3 grupos de acordo com a significância nutricional em humanos: elementos essenciais: I, Zn, Se, Cu, Mo, Cr, Fe e Co; elementos provavelmente essenciais: Mn, Si, Ni, B, V; elementos potencialmente tóxicos, alguns dos quais podem contudo apresentar algumas funções essenciais em níveis baixos de concentração: F, Pb, Cd, Hg, As, Al, Li, Sn (WHO, 1996).

Sabe-se que alguns elementos traços representam importantes fatores de risco quando em concentrações alteradas, uma vez que podem induzir desordens patológicas (CARVALHO et al., 2007). A distribuição dos elementos traços nos órgãos e fluidos corporais é, na maioria das vezes, heterogênea e além disto, vários

desses elementos desempenham um papel importante na carcinogênese (MAJEWSKA et al., 1997).

Mediante ao supracitado sabe-se que a fumaça do tabaco é uma mistura com mais de 5.000 substâncias, e muitas delas são tóxicas e cancerígenas (TALHOUT et al., 2011). Entre as inúmeras substâncias tem-se vários compostos inorgânicos como o arsênio, cálcio, cloro, cobalto, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, níquel, potássio, zinco e outros (STEDMAN, 1968; FOWLES; BATES, 2000; TALHOUT et al., 2011).

O níquel, por exemplo, presente na fumaça do cigarro é um co-carginógeno que atua indiretamente sobre o DNA e funciona como sinalizador das vias de vários genes (CHEN et al., 2001; CRUZ et al., 2004; HUANG et al., 1996). Ainda induz alta frequência de silenciamento por metilação e desacetilação de caudas de histonas em regiões promotoras, bem como uma variedade de modificações nas histonas, como acetilação, fosforilação e ubiquitinização (GOLEBIEWSKI; KASPRZAK, 2005). O níquel ainda pode substituir o núcleo metálico de algumas proteínas alterando então sua atividade e prejudicando a homeostase do organismo (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

Outro exemplo é o arsênico, sua exposição crônica está associada a um risco aumentado de câncer de pele, pulmões, bexiga, fígado, e possivelmente rins (Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), 2004), bem como uma série de efeitos não cancerígenos (RAHMAN et al. 2007; STATES et al., 2009; WHO 2001). A exposição crônica pode ocorrer por meio do hábito tabagista, é comprovado que o arsênio é constituinte do cigarro e foi identificado e medido tanto no tabaco quanto na fumaça (CHANG et al., 2005). Observa-se também que a presença do elemento arsênio em amostras biológicas da população humana é maior em fumantes do que aqueles não fumantes. (AFRIDI et al., 2010; BABALOLA et al., 2007).

Os íons cloreto desempenham um papel relevante na homeostase celular e a variação do seu fluxo está associado a regulação do volume, processos secretórios e manutenção do pH celular (FOSKETT, 1998; AUZANNEAU et al, 2006). Contudo, pouco é esclarecido sobre o peso que alguns elementos podem ter sobre os fatores prognósticos. Em câncer gástrico, por exemplo, a presença do íon cloreto no

citoplasma é fator chave para a acidificação lisossomal e a autofagia (HOSOGI et al., 2014).

Estudos recentes demonstram que íons cloreto tem a capacidade de atuar como segundo mensageiro, uma vez que sua concentração dentro da célula é dinâmica, sendo capaz de modular a atividade de proteínas transferina, glicose-6-fosfatase e hemoglobina, dentre outras (CHEN et al, 2001). O papel dos íons cloreto na fisiologia celular é bem definido, contudo a sua relação com a patogênese do câncer não é clara. Os canais de cloro ganharam destaque a partir da descoberta da ligação da *multidrug resistance protein* (MDR/ P-glycoprotein) a atividade dos canais de cloreto ativados por volume nas células cancerígenas de pacientes submetidos à quimioterapia (SUH; YUSPA 2005).

Elementos, metais ou não, em tumores tem sido associada a progressão e possível prognóstico. Em tumores de mama, diversos trabalhos reportaram o papel de elementos na gênese e progressão deste tipo de câncer. Majewska et al., (1997), por exemplo, relataram diferenças nas concentrações dos elementos P, S, K, Ca, Mn, Fe, Se e Rb, quando comparados tumores benignos e malignos. Silva et al., (2012) relataram ainda que a quantificação de elementos traços é um potencial marcador em tumores mamários e destacam que pacientes com a presença do elemento cromo apresentaram uma menor sobrevida. Geraki et al., (2004), destacaram que as concentrações dos elementos potássio e zinco foram maiores em tumores da mama quando comparados a tecido mamário normal.

A exposição ao longo da vida a altas concentrações de Cr (VI) na água potável resulta em danos intestinais e aumento dos tumores duodenais em camundongos. Contudo, dados indicam que Cr (VI) não afeta o comportamento células intestinais e fornecem evidências que o modo de ação para o câncer intestinal induzido por Cr (VI) em camundongos envolve ferimento crônico que resulta em hiperplasia da cripta de enterócitos (THOMPSON et al., 2015).

O cobre tem sido relacionado com a angiogênese, processo no qual são formados novos vasos capilares a partir da vasculatura existente. A interrupção no fornecimento de cobre em células tumorais e sistemas de xenoenxerto, demonstrou a inibir a angiogênese. No entanto, a base biológica para a sensibilidade da angiogênese ao cobre permanece obscura (FINNEY et al., 2009).

**CAPÍTULO 1: ELEMENTAL CHARACTERIZATION IN SQUAMOUS  
CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND ITS RELATIONSHIP  
WITH PROGNOSIS AND SURVIVAL**

Artigo submetido: Oral Oncology

## ELEMENTAL CHARACTERIZATION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS AND SURVIVAL

### Authors

Anderson Barros Archanjo<sup>1\*</sup>, Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis<sup>1</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Rafael Pereira de Souza<sup>2</sup>, Rafael de Cicco<sup>2</sup>, Mayara Mota de Oliveira<sup>1</sup>, Aline Ribeiro Borçoi<sup>1</sup>, Júlia de Assis Pinheiro<sup>1</sup>, Lucas de Lima Maia<sup>1</sup>, Gabriela Tonini Peterle<sup>1</sup>, Kelly Cristina Saito<sup>3</sup>, Edna Teruko Kimura<sup>3</sup>, Marcos Brasilino de Carvalho<sup>4</sup>, Fábio Daumas Nunes<sup>5</sup>, Eloiza Tajara<sup>6</sup>, Marcelo dos Santos<sup>7</sup>, Breno Valentim Nogueira<sup>1</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>8</sup>, Christiano Jorge Gomes Pinheiro<sup>9</sup>, Adriana Madeira Álvares-da-Silva<sup>1</sup>

### Affiliations

1Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo

2Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho

3Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

4Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Heliópolis

5Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo

6Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

7Escola Multicampi de Ciências Médicas do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

8Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo

9Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo

**\*Corresponding Author:** Anderson Barros Archanjo. Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Biologia. Address: Alto Universitário s/n, Alto Universitário, caixa postal 16, Alegre, ES, Brazil. Zip code: 29500-000. Phone: 55 28 3552 8622, FAX: 55 28 3552 8627, e-mail: andersonarchanjo@gmail.com

**Running title:** Elemental Characterization, oral squamous cell carcinoma

**Keywords:** Oral Squamous Cell Carcinoma, Elemental Characterization, Smoking, Magnesium, Phosphorus, Chlorine, Chromium, Manganese, Cobalt, Nickel.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Grant support:** This work was supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo* (Processes: 69918147/15 and 80706487/18).

## Abstract

**Objectives:** With the present study we aimed to perform elementary characterization, according to smoking, in samples of cancer of the oral cavity and to relate with the prognostic factors and survival.

**Materials and methods:** For this, we used samples from 78 patients surgically treated from Head and Neck Surgery Department of Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute (ICAVC), São Paulo, Brazil.

Samples were categorized according to the smoking habit being: never, stopped and current habit.

The elementary characterization was performed by  $\mu$ XRF were performed in the D09-XRF X-ray Fluorescence light line at the National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil.

The Chi square, Fisher exact tes and Multivariate logistic was used. Survival was calculated by the number of months between surgery and death for each patient or the last appointment in case the patient was alive.

**Results:** The following elements were detected: magnesium, phosphorus, sulfur, chlorine, potassium, calcium, chromium, manganese, iron, zinc, cobalt, nickel, copper, arsenic and bromine, so that they were associated with smoking habits, current consumption. Regarding the prognosis, magnesium was related to disease-free survival and chlorine and chromium with relapse so that these were shown to be a protective factor against the occurrence of relapse.

**Conclusion:** Thus, we characterize oral cancer with the presence of the elements above according to smoking. The study presents unpublished data about the relationship of the profile of elements in squamous cell carcinoma samples of the oral cavity with the habits, the prognosis and the survival of the patients.

## Introduction

Head and neck cancer is considered a highly malignant and aggressive type with a high morbidity and mortality profile [1], which one of the major subgroups is oral cancer accounting for 40% of tumors, being for 382,000 (2.21%) cases and 176,000 (1.97%) cancer deaths worldwide in the year 2016, with two-thirds occurring in men [2,3].

Among the histological variants of oral cavity cancer, squamous cell carcinoma accounts for more than 90% of the cases [4,5], and affects mainly individuals between 50 and 70 years of age with the consumption habit of tobacco and alcohol, and may also be due to HPV infection, genetic susceptibility and passive smoking [4-8].

Individual or combined consumption of tobacco and alcohol are indicated as the main factors associated with risk of oral cancer. Tobacco smoke itself, which contains hundreds of known carcinogenic molecules [9], is capable of acting provoking a probable induction of DNA damage [10].

It is known that tobacco smoke is a mixture with more than 5,000 substances, and many of them are toxic and carcinogenic [11]. Among those substances, there are several inorganic compounds such as arsenic, calcium, chlorine, cobalt, copper, chromium, iron, magnesium, manganese, nickel, potassium, zinc and others [12,13].

The main functions of such elements are described in the literature. Arsenic, for example, may induce the increase of reactive oxygen species causing damage to proteins, lipids and DNA [14]. Nickel, on the other hand, induces high frequency of silencing by methylation and deacetylation of histone tails in promoter regions [15]. Chloride ions play an important role in cellular homeostasis and its flow variation is associated with volume regulation, secretory processes and maintenance of cellular pH [16,17].

However, the weight of some elements in prognostic factors is not clear. In gastric cancer, for example, the presence of the chloride ion in the cytoplasm is a key factor for lysosomal acidification and autophagy [18].

In breast tumors, a few papers report the role of elements in the genesis and progression of breast cancer. For example, Majewska et al. [19] report differences in the concentrations of P, S, K, Ca, Mn, Fe, Se, and Rb elements when comparing benign and malignant breast tumors.

Silva et al. [20] also reported that the quantification of trace elements is a potential marker in breast tumors and emphasize that patients with the presence of the copper element presented lower survival.

Geraki et al., [21], point out that potassium and zinc concentrations were higher in breast tumors.

Therefore, our objective was to perform the elementary characterization, according to smoking, in samples of cancer of the oral cavity and to correlate with the prognostic factors and survival.

## **Material and methods**

### *Ethics*

This study was approved by the Committees of Ethics Research of the Federal University of Espírito Santo (1.359.363) and the Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute (1.422.077). The informed consent term was waived.

### *Samples*

Samples were collected by the Head and Neck Genome Project (GENCAPO), a collaborative consortium created in 2002 with more than 50 researchers from 9 institutions in São Paulo State, Brazil, whose aim is to develop clinical, genetic and epidemiological analysis of HNSCC. In this study, 78 tumoral tissue samples were obtained and used for elementary characterization, within a total of 78 patients with oral squamous cell carcinomas, surgically treated at the Head and Neck Surgery Department of Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute (ICAVC), São Paulo, Brazil, during the period of January/2012 to May/2015. The clinical follow-up was at least 24 months after surgery. Previous surgical or chemotherapeutic treatment, distant metastasis, no removal of cervical lymph nodes and positive surgical margins were exclusion criteria. Histopathological slides were reviewed by a senior pathologist to confirm the diagnosis and select appropriate areas for analysis.

Among analyzed individuals, mean age was 63.69 years ( $df \pm 11.01$ ) being 54 (69.3%) for men and 24 (30.7%) for women (Table 1).

**Table 1.** Epidemiological and prognostic features.

Features	Total	
	No.	(%)
<b>Gender</b>		
Female	24	30.7
Male	54	69.3
<b>Age, yr</b>		
mean 63,69, df±11,01		
<b>Smoker</b>		
No	14	17.9
Yes, in the past	23	29.5
Yes, currently	41	52.6
<b>Alcohol user</b>		
No	17	21.8
Yes, in the past	27	34.6
Yes, currently	34	43.6
<b>Therapy</b>		
<b>Radiotherapy</b>		
No	25	32.1
Yes	53	67.9
<b>Chemotherapy</b>		
No	59	75.6
Yes	19	24.4
<b>Disease relapse</b>		
No	63	80.7
Yes	15	19.3
<b>Disease specific death</b>		
No	49	62.8
Yes	29	37.2
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100.0</b>

The samples were categorized according to the smoking habit being: never, stopped and current habit. For the history of tobacco consumption, the samples were categorized in: Already consumed tobacco (No: never, Yes: stopped + current) and currently consume tobacco (No: never + stopped, Yes: current).

### *Tissue microarrays*

Tissue microarrays (TMA) were made using 10% buffered formalin-fixed sections embedded in paraffin of 78 primary oral cavity epidermoid carcinomas of patients surgically treated at the ICAVC, following a methodology described by Cajaiba et al., [22]. Two representative tumor areas was performed by two experienced pathologists from slides stained with Hematoxylin and Eosin. Two 1.5 mm diameter cylinders were drilled from each sample and reintroduced into paraffin receptor blocks using a tissue microarrayer (Beecher Instruments®, Silver Spring, MD, USA). Sections were then removed from the TMA, mounted on microscopy slides. A pathologist checked the content of each spot. Spots bent or missing more than 70% of the tissue were excluded.

### *Elementary characterization*

The measurements of  $\mu$ XRF were performed in the D09-XRF X-Ray Fluorescence light line at the National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil [23]. After removal of the histological sections, the tumor tissue cylinders were removed from the TMA and underwent dewaxing and rehydration with xylene and alcohol, respectively.

The samples, with a mean thickness of 450  $\mu$ m and a density of 0.54 g / cm<sup>3</sup>, were placed on plastic support with Ultralene® film and taken to the D09-XRF light line equipment. To obtain the spectra, a white beam with a power range of 4 to 24 keV and dimensions of 2 mm<sup>2</sup> was used to excite the samples for 20 seconds. The fluorescent X rays emitted by the samples were detected using a high-resolution spectrometer, based on a Silicon Drift detector with 8  $\mu$ m thick beryllium window and active area of 7 mm<sup>2</sup>. A 45 mm aluminum filter was used in the bundle and the sample holder was positioned at 21 mm and at a 45 ° angle to the detector. All measurements were performed at room temperature and normal pressure.

Nine measurements were performed in a 3x3 matrix and averaged to obtain the final spectrum used in the analyzes. For the adjustment of the characteristic X-ray spectra, determination of the elements and their respective fluorescent intensities, the PyMca 5.0.0 program was used [24].

### *Statistical Analysis*

The chi square and Fisher exact tests were used for association analysis (significance considered when  $p < 0.05$ ). Multivariate logistic regression was used to obtain odds ratio (OR) and confidence intervals (CI  $\geq 95\%$ ). Survival was calculated by the number of months between surgery and death for each patient or the last appointment in case the patient was alive. To calculate disease-free survival, the time endpoint was the date of disease relapse. The Kaplan-Meier model was used for survival analysis, using the Wilcoxon p-value and the Cox Proportional Hazards to adjust p-values, obtain hazard ratio (HR) and confidence intervals (CI  $\geq 95\%$ ). The values of OR and HR were adjusted by lymph node status (TNM). Statistical calculations were performed using the IBM SPSS STATISTICS® v. 20, 2011 softwares.

## Results

### *Smoking and elementary characterization*

With obtained data it was possible to carry out the elementary characterization of oral squamous cell carcinoma samples from 78 patients. The following elements were detected by used technique: magnesium, phosphorus, sulfur, chlorine, potassium, calcium, chromium, manganese, iron, zinc, cobalt, nickel, copper, arsenic and bromine.

When stratifying the elementary characterization by smoking, a significant association of smoking habit were verified with elements magnesium ( $p=0.000$ ), where the highest magnesium presence rate was found in the individuals who stopped smoking; chromium ( $p=0.006$ ), in which the highest rate of this element was in individuals who abandoned smoking; manganese ( $p=0.002$ ), individuals who never smoked were not present and for both arsenic and bromine elements ( $p = 0.011$  for both), which those who stopped or smoked had the highest rates of presence of the elements (Supplementary table 1).

Regarding de history of tobacco use, arsenic and bromine showed association ( $p = 0.026$  for both), where such elements were absent in most individuals who never consumed tobacco. Data also revealed an association between the chromium element and the historical one ( $p=0.003$ ), where chromium was absent in most cancer samples of individuals who never consumed tobacco (Supplementary table 1).

About current tobacco consumption, stratification of the elementary characterization presented an association between the chlorine element and the current consumption of tobacco ( $p = 0.043$ ), in which only 25% of the individuals who consume tobacco currently had the presence of the element chlorine in tumor samples and nickel ( $p=0.005$ ), where the element was present in less than 3% of the tumor samples of patients who do not currently consume tobacco (Supplementary table 1).

### *Epidemiological and prognostic factors in oral cancer*

When verifying the relation of the epidemiological factors with the prognosis in oral cancer, it was observed that among the 78 patients studied the recurrence occurred in 15 patients (19.3%). Of these, one patient was female (6.7%) and 14 males (93.3%). For age, relapse occurred in 12 patients aged less than 63 years (80.0%) and in three patients older than 63 years (20.0%) (Table 2).

Relapse showed a significant association with age and sex ( $p = 0.017$  and  $p = 0.020$ , respectively, Table 2). The multivariate analysis showed that the age over 63 years is a protective factor for recurrence (OR = 0.194, CI = 0.04-0.93, Table 3) and that male is a risk factor for relapse (OR = 9.095, CI = 0.95-87.10, Table 3). Sex was also significantly associated with disease-free survival (Wilcoxon  $p = 0.019$ ). It is observed that in the first 18 months after surgery 25% of the male patients presented recurrence while only 5% of the female patients relapsed (Figure 1a).

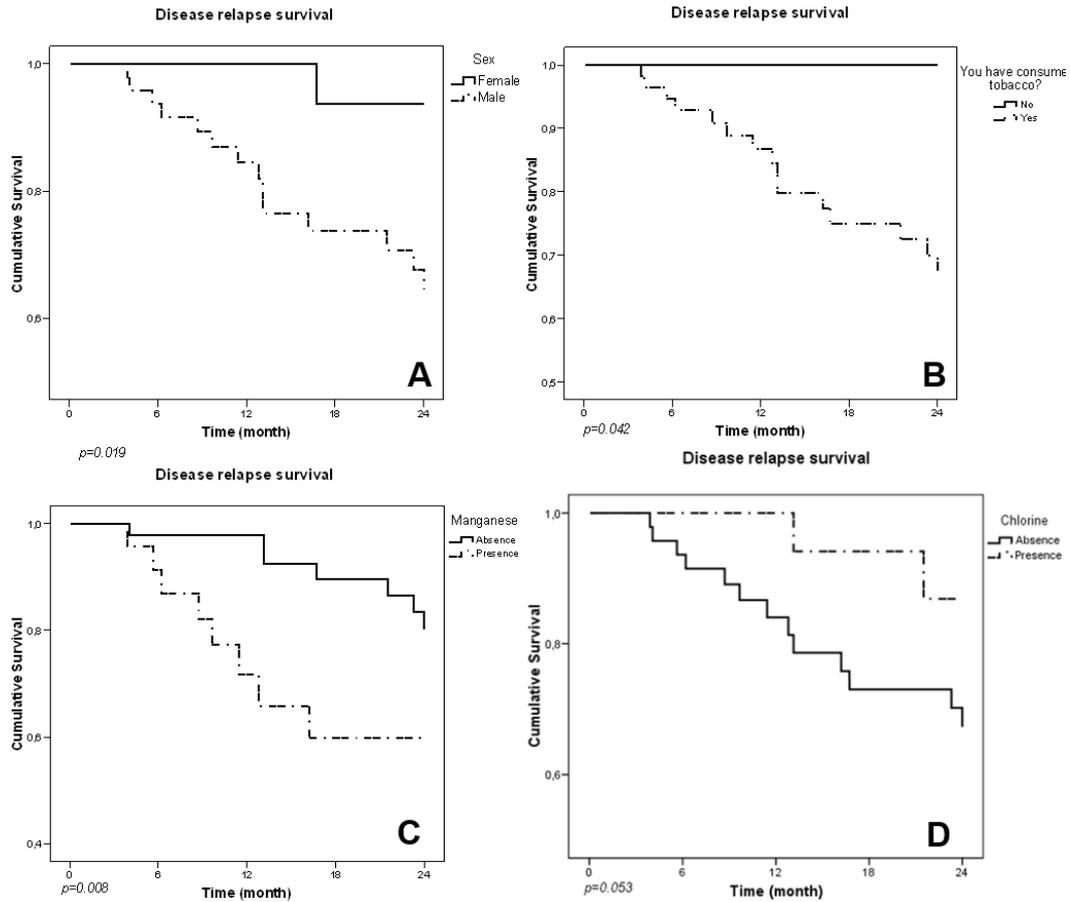
Recurrence also showed a significant association with history of smoking, alcohol consumption, history of alcohol consumption and current alcohol consumption ( $p = 0.037$ ,  $p = 0.042$ ,  $p = 0.016$  and  $p = 0.043$ , respectively, Table 2). And the history of smoking showed a significant association with disease-free survival (Wilcoxon  $p = 0.042$ ). It is observed that at 18 months after surgery, 25% of patients with a history of tobacco use had recurrence while those who never consumed tobacco did not recur (Figure 1b).

For death from cancer, it was observed that of the 78 patients studied, 29 died of cancer (37.2%). Of these, five were female (17.2%) and 24 males (82.8%). Of the patients younger than 50 years 2 died of cancer (6.9%), in the age range of 51 to 60 years the total number of deaths was 15 patients (51.7%) and 12 patients older than 60 years were death (41.9%) (Table 2).

In a bivariate analysis, death was significantly associated with gender, age, history of tobacco consumption, current consumption of tobacco, alcohol consumption and current alcohol consumption ( $p = 0.039$ ,  $p = 0.030$ ,  $p = 0.045$ ,  $p = 0.022$ ,  $p = 0.040$  and  $p = 0.011$ , respectively, Table 2).

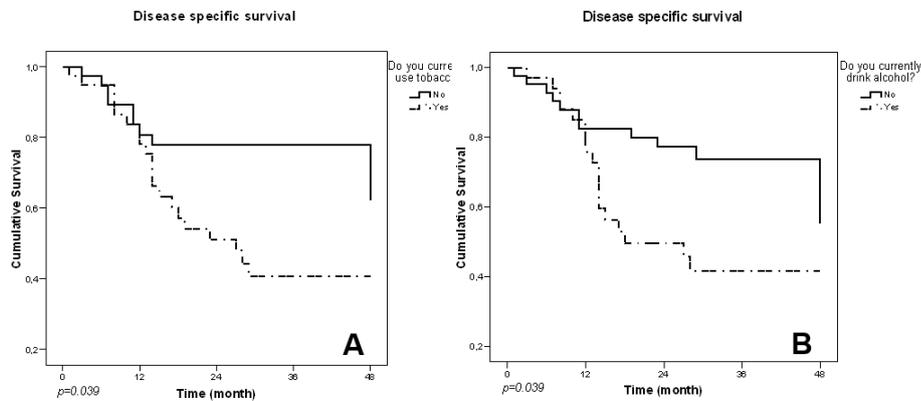
**Table 2.** Epidemiological and therapeutic characteristics versus prognostic characteristics.

Characteristic	Recurrence				P value	Death				P value
	No		Yes			No		Yes		
	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)	
<b>Sex</b>										
Female	23	36.5	1	6.7	<b>0.020</b>	19	38.8	5	17.2	<b>0.039</b>
Male	40	63.5	14	93.3		30	61.2	24	82.8	
<b>Age</b>										
≤ 63 years	29	46.0	12	80.0	<b>0.017</b>	22	44.9	19	65.5	0.078
> 63 years	34	54.0	3	20.0		27	55.1	10	34.5	
<b>Age group</b>										
≤ 50 years	5	7.9	2	13.3	0.104	5	10.2	2	6.9	<b>0.030</b>
51 a 60 years	18	28.6	8	53.3		11	22.4	15	51.7	
> 60 years	40	63.5	5	33.3		33	67.3	12	41.9	
<b>Smoking</b>										
Never	14	22.2	0	0.00	0.121	12	24.5	2	6.9	0.051
Stopped	17	27.0	6	40.0		16	32.7	7	24.1	
Current	32	50.8	9	60.0		21	42.9	20	69.0	
<b>History of tobacco consumption</b>										
No	14	22.2	0	0.00	<b>0.037</b>	12	24.5	2	6.9	<b>0.045</b>
Yes	49	77.8	15	100.0		37	75.5	27	93.1	
<b>Current tobacco consumption</b>										
No	31	49.2	6	40.0	0.521	28	57.1	9	31.0	<b>0.022</b>
Yes	32	50.8	9	60.0		21	42.9	20	69.0	
<b>Alcoholism</b>										
Never	17	27.0	0	0.00	<b>0.042</b>	13	26.5	4	13.8	<b>0.040</b>
Stopped	22	34.9	5	33.3		20	40.8	7	24.1	
Current	24	38.1	10	66.7		16	32.7	18	62.1	
<b>History of alcohol consumption</b>										
No	17	27.0	0	0.00	<b>0.016</b>	13	26.5	4	13.8	0.151
Yes	46	73.0	15	100.0		36	73.5	25	86.2	
<b>Current alcohol consumption</b>										
No	39	61.9	5	33.3	<b>0.043</b>	33	67.3	11	37.9	<b>0.011</b>
Yes	24	38.1	10	66.7		16	32.7	18	62.1	
<b>Radiotherapy</b>										
No	22	34.9	3	20.0	0.213	17	34.7	8	27.6	0.516
Yes	41	65.1	12	80.0		32	65.3	21	72.4	
<b>Chemotherapy</b>										
No	51	81.0	8	53.3	<b>0.025</b>	42	85.7	17	58.6	<b>0.007</b>
Yes	12	19.0	7	46.7		7	14.3	12	41.4	
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>100.0</b>	<b>15</b>	<b>100.0</b>		<b>49</b>	<b>100.0</b>	<b>29</b>	<b>100.0</b>	



**Figure 1.** Disease-free survival curve of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity according to sex (A), current tobacco consumption (B), manganese (C) and chlorine (D).

Current tobacco consumption showed a significant association with disease-specific survival (Wilcoxon  $p = 0.039$ ). In the first 36 months after the surgical follow-up, approximately 20% of non-smokers currently died of cancer, while in the same period 60% of those who consumed tobacco today died (Figure 2a).



**Figure 2.** Disease-specific survival curve of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity according to current tobacco consumption (A) and current alcohol consumption (B).

Current alcohol consumption revealed a significant association with specific disease survival (Wilcoxon  $p = 0.039$ ). It is noted that in the first 36 months after the surgical treatment approximately 25% of patients who do not consume alcohol are currently dead and 60% of those who consume alcohol are currently dead in the same period (Figure 2b). The multivariate analysis revealed that current alcohol consumption is a risk factor for death due to this cancer (OR = 2,844, CI = 1.00-8.01, Table 3) and risk factor for a worse specific disease survival (HR = 1,804, CI = 0.80-4.06, Table 4).

**Table 3** – Multivariate analysis of recurrence, death, lymph node status, sex, age, history of alcohol consumption and status of the chlorine element.

Variables	Multivariate analysis			
	Rurrence		Death	
	OR (CI 95%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)	<i>p</i>
<b>N (TNM)*</b>				
Negative	1		1	
Positive	4.912 (1.20-20.06)	<b>0.027</b>	5.614 (1.93-16.26)	<b>0.001</b>
<b>Sex</b>				
Female	1			
Male	9.095 (0.95-87.10)	0.055		
<b>Age</b>				
≤ 63 years	1			
> 63 years	0.194 (0.04-0.93)	<b>0.040</b>		
<b>Current alcohol consumption</b>				
No			1	
Yes			2.844 (1.00-8.01)	<b>0.048</b>
<b>Chlorine</b>				
Absence	1			
Present	0.105 (0.01-0.63)	<b>0.014</b>		

\*TNM classification 7th edition.

**Table 4** – Multivariate analysis of disease-free survival, disease-specific survival, lymph node status, age, current alcohol consumption, status of chlorine and manganese elements.

Variables	Cox Proportional		Cox Proportional	
	Disease relapse survival		Disease specific survival	
	HR (CI 95%)	<i>p</i>	HR (CI 95%)	<i>p</i>
<b>N (TNM)*</b>				
Negative	1		1	
Positive	5.021 (1.73-14.56)	<b>0.003</b>	3.081 (1.38-6.85)	<b>0.006</b>
<b>Age</b>				
≤ 63 years	1			
> 63 years	0.264 (0.07-0.95)	<b>0.042</b>		
<b>Current alcohol consumption</b>				
No			1	
Yes			1.804 (0.80-4.06)	0.154
<b>Chlorine</b>				
Absence	1			
Present	0.194 (0.04-0.87)	<b>0.033</b>		
<b>Manganese</b>				
Absence			1	
Present			1.751 (0.81-3.75)	0.151

\*TNM classification 7th edition.

### *Elements and prognosis in oral cancer*

When verified the association of elements found with prognosis of patients with oral cancer, we noticed the relation of some elements with prognosis.

Regarding the manganese element, an association with disease-free survival can be observed (Wilcoxon  $p=0.008$ ). It is shown that in the first 12 months after surgical follow-up, approximately 30% of patients with manganese present in the oral cavity cancer samples presented recurrence while less than 5% of the non-manganese patients relapsed (Figure 1c).

For elemental characterization stratified by relapse, we observed a significant association between chlorine and chromium with relapse ( $p = 0.037$  and  $p = 0.034$ , respectively, supplementary table 2). In the multivariate analysis, it can be verified that the presence of the chlorine element in the samples of tumors of the oral cavity is an independent protection factor for the relapse, generating a reduced risk (OR = 0.105, CI = 0.01-0.63, Table 3).

For this element, we also found that at 18 months after the surgical follow-up, 25% of the patients without chlorine recurred, whereas in the same period only 5% of the patients with the chlorine element presented recurrence (Figure 1d). The multivariate analysis revealed that the presence of the chlorine element is an independent protective factor for better disease-free survival, conferring a reduced risk (HR = 0.194, CI = 0.04-0.87, Table 4).

### **Discussion and conclusions**

Tobacco smoke is a complex, dynamic and reactive mixture with more than 5,000 chemicals [25]. Among the thousands of substances may find various compounds such as magnesium metal, potassium, calcium, chromium, manganese, iron, cobalt, nickel, copper and zinc, semimetal arsenic, non-metal chlorine, enter another [11, 12, 13].

In our study the elements magnesium, chromium, manganese, arsenic and bromine were associated with smoking habits. The elements chromium, cobalt, arsenic and bromine were associated with the history of tobacco consumption while the elements chlorine and nickel with current consumption of tobacco. These relationships are because cigarette smoke, when ingested, leads to innumerable chemical substances and compounds, among them the elements found in the tumor samples of the present study.

The relationship of some of these elements with carcinogenesis is described in the literature, but their role in prognostic factors is still poorly understood. To our knowledge, this is the first study to perform elemental characterization of tumor samples from patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and to correlate with epidemiological, prognostic and survival factors. A similar approach was performed in patients with breast cancer [19, 20, 21].

In relation to the genus, it is not yet recognized as a prognostic factor for oral cancer, although some authors have pointed to different patterns of sociodemographic and clinical-pathological distribution in men compared to women [26-30].

In a study, Jerjes et al. [31] identified relapse in 23/65 men and 20/50 women, and the gender factor was not identified as risk. In the present study, the relapse was higher among men and the multivariate analysis indicated the male gender as a risk factor for relapse. These factors may be due to the fact that oral cavity cancer affects more males than females, with a mean proportion of 3.09/1 [32-35], in our study the proportion was 2.25/1.

Moreover, the different health outcomes between men and women may be due to different exposures to social factors throughout life, however, it is not clear that there is a greater vulnerability to exposures by women compared to men, suggesting that the odds are similar for poor health impacts of both [36].

Regarding age, it was verified that patients over 63 years old presented less relapse, that is, the age over 63 years proved to be a protective factor for the occurrence of relapse and for better disease-free survival. In fact, several authors point out that younger patients have a worse prognosis [31]. In the United States, Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER) report that cancer of the oral cavity and pharynx is most often diagnosed in people between 55 and 64 years of age, with median age at 63 years [37].

It is also known that squamous cell carcinoma mainly affects individuals aged between 50 and 70 years who have the smoking and alcohol habits, as well as HPV infection and genetic susceptibility [4, 6, 8].

Tobacco and alcohol consumption are indicated as the main factors associated with the risk of oral cancer [3]. And the associated consumption of the two act synergistically and increases the risk of developing oral cavity cancer by 65% [38]. In our study, we identified an association between relapse

and history of tobacco use, alcohol consumption, history of alcohol consumption, and current consumption of alcohol.

The death from this cancer was associated with the history of tobacco consumption, current tobacco consumption, alcohol consumption and current consumption of alcohol. The multivariate analysis showed the current consumption of alcohol as a risk factor for death and worse disease-specific survival.

In fact, data from the World Health Organization show that there is a growing number of problems associated with excessive consumption of alcohol and tobacco [39]. In head and neck tumors, the magnitude of the risk is due to the synergism between alcohol consumption and smoking where the risks are multiplied [40], and both of which lead to a higher risk of oral cavity cancer in men than in women [41].

Moreover, tobacco consumption and alcohol influence overall survival, which highlights the need to help patients to stop using these substances [42]. In addition, studies point to consistent evidence that patients who maintain a smoking habit after being diagnosed with head and neck cancer have the lowest survival rates and the highest rates of recurrence [43].

Regarding the elemental characterization, of the elements found in the samples, chromium was associated with relapse and manganese with disease-free survival.

Chromium in low concentrations can be used for medicinal purposes, being also involved in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, but in sufficiently high concentrations it becomes toxic and carcinogenic [44]. Chromium acts in the body as a cofactor in insulin, facilitating its connection with receptors [45].

The chlorine element was associated with relapse, as a protective factor for recurrence and for better disease-free survival. Chloride ions play an important role in cellular homeostasis under physiological and pathological conditions, with greater physiological relevance. Thus, the variation in Cl<sup>-</sup> flux is associated with cell volume regulation, secretory processes and maintenance of cellular pH, essential to maintain enzymatic activity, as well as the cell cycle [16, 17, 46, 47].

Recent studies have shown that chloride ions have the ability to act as a second messenger, since their concentration within the cell is dynamic, being able to modulate the activity of transferrin, glucose-6-phosphatase and hemoglobin proteins, among others [48].

The role of chloride ions in cellular physiology is well defined, yet its relation to the pathogenesis of cancer is unclear. Chlorine channels have gained prominence from the discovery of the binding of multidrug resistance protein (MDR/P-glycoprotein) to the activity of volume-activated chloride channels in the cancer cells of patients undergoing chemotherapy [49].

In our study, the relationship between the presence of the chlorine element as a protection factor for recurrence and better disease-free survival can be explained by some factors: 1) alteration in intracellular pH - tumor cells reside in an acid environment and intracellular processes compensate conditions to maintain viability and proliferation [50]; 2) changes in the actin cytoskeleton - several members of the CLC family bind to the actin cytoskeleton and actin binding is important for the regulation of Cl transport by these proteins [51]; 3) cell cycle interference - the chloride channel activity of the CLC and CLIC families were associated with changes in the cell cycle, CLC2 is regulated by cdc2/cyclinB suggesting a mechanism for the activation of the M phase [52], CLIC-4 is located in the centrosome and middle of the M-phase cells and CLIC-1 is expressed on the plasma membrane during phase M of CHO-K1 cells [53].

The mechanisms shown suggest that patients with the presence of chlorine may have some alteration in the chlorine kernels and therefore present this element more and this possible change is favoring the apoptosis of tumor cells, preventing / diminishing the relapse and increasing the survival. However, further studies to verify possible changes in chlorine channels are appropriate, based on the results presented here.

In addition, the study presents unpublished data the relation of the profile of elements in oral squamous cell carcinoma samples of the oral cavity with habits, prognosis and survival of patients.

## **Acknowledgements**

To Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Proposal 20150102 - Elemental micro-imaging and quantification of squamous cell carcinoma head and neck, microenvironment tumor and its relationship with hypoxia gene expression and oxidative stress).

## **References**

- [1] JOU A, HESS, J. Epidemiology and molecular biology of head and neck cancer. *Oncology Research and Treatment* 2017; 40(6): 328-332.
- [2] GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, Regional, and National

Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology* 2017; 3(4): 524–548.

[3] DÖBRÓSSY L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005; 24(1): 9-17.

[4] LEEMANS CR, BRAAKHUIS BJ M, BRAKENHOFF RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11:9–22.

[5] PFISTER DG, ANG K, BRIZEL DM, BURTNES BA, CMELAK AJ, COLEVAS AD, et al. Head and Neck Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2011; 9(6): 596-650.

[6] GILLISON ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29(8):779-92.

[7] SAPKOTA A, HSU CC, ZARIDZE D, SHANGINA O, SZESZENIA-DABROWSKA N, MATES D, et al. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes & Control* 2008; 19(10):1161-1170.

[8] HAN S, CHEN Y, GE X, ZHANG M, WANG J, ZHAO Q, et al. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. *BMC Public Health* 2010; 10(196):1–12.

[9] SINGH S, PILLAI S, CHELLAPPAN S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *Journal of Oncology* 2011; 2011.

[10] HECHT SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10):733-44.

[11] TALHOUT R, SCHULZ T, FLOREK E, VAN BENTHEM J, WESTER P, OPPERHUIZEN A. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8(2): 613–628.

[12] STEDMAN RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev.* 1968; 68(2):153-207.

[13] FOWLES J, BATES M. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities for Harm Reduction. *Chemical constituents, cigarettes & cigarette smoke* 2000.

[14] LIU X, GAO X, LIANG X, TANG Y. The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oncotarget* 2016; 7(40): 66226–66238, 2016.

[15] GOLEBIEWSKI F, KASPRZAK KS. Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel (II). *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 279:133–139.

[16] FOSKETT JK. CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60:689-717.

[17] AUZANNEAU C, NOREZ C, NOËL S, JOUGLA C, BECQ F, VANDEBROUCK C.

Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells. *Reprod Nutr Dev.* 2006;46(3):241-55.

[18] HOSOGI S, KUSUZAKI K, INUI T, WANG X, MARUNAKA Y. Cytosolic chloride ion is a key factor in lysosomal acidification and function of autophagy in human gastric cancer cell. *J Cell Mol Med.* 2014 Jun;18(6):1124-33.

[19] MAJEWSKA U, BRAZIEWICZ J, BANAŚ D, KUBALA-KUKUŚ A, GÓZDŹ S, PAJEK M, et al. An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. *Biological trace element research* 1997; 60(1–2):91–100.

[20] SILVA MP, SOAVE DF, RIBEIRO-SILVA A, POLETTI ME. SILVA, M. P. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: A study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Research Notes* 2012; 5(194): 1–11.

[21] GERAKE K, FARQUHARSON MJ, BRADLEY DA. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. *Physics in Medicine and Biology* 2004; 49(1): 99–110.

[22] CAJAIBA MM, NEVES JI, CASAROTTI FF, DE CAMARGO B, CHAPCHAP P, SREDNI ST, SOARES FA. Hepatoblastomas and liver development: a study of cytokeratin immunoexpression in twenty-nine hepatoblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 2006; 9(3):196–202.

[23] PERÉZ CA, RADTKE M, SÁNCHEZ HJ, et al. Synchrotron radiation X-ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. *X-Ray Spectrometry* 1999; 28(5): 320-326, 1999.

[24] SOLÉ VA, PAPILLON E, COTTE M, et al. A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescent spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 2007; 62(1): 63-68.

[25] HOFFMANN D. Tobacco Smoke Components. *Beitrage Zur Tabakforschung international* 1998; 18(1): 49-52.

[26] 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 Oncology* 2011; 47:400–407.

[27] CHEN CJ, SUNG WW, LIN YM, CHEN MK, LEE CH, LEE H, et al. Gender Difference in the Prognostic Role of Interleukin 6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 2012; 7(11): e50104.

[28] GARAVELLO W, SPREAFICO R, GAINI RM. Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. *Oral Oncology* 2007; 43:894–897.

[29] GIROD A, MOSSERI V, JOUFFROY T, POINT D, RODRIGUEZ J. Women and Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity and Oropharynx: Is There Something New? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009; 67: 1914–1920.

[30] OLIVEIRA LR; RIBEIRO-SILVA A; ZUCOLOTO S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. *Jornal Brasileiro de*

Patologia e Medicina Laboratorial 2006; 42(5):385–392.

[31] JERJES W, UPILE T, PETRIE A, RISKALLA A, HAMDOON Z, VOURVACHIS M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head and Neck Oncology* 2010, 2(9): 1–21.

[32] LÓPEZ RV, ZAGO MA, ELUF-NETO J, CURADO MP, DAUDT AW, DA SILVA-JUNIOR WA, et al. Education, tobacco smoking, alcohol consumption, and IL-2 and IL-6 gene polymorphisms in the survival of head and neck cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44(10):1006–1012.

[33] ADRIEN J, BERTOLUS C, GAMBOTTI L, MALLET A, BAUJAT B. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. *Oral Oncology* 2014; 50(2): 90–97.

[34] OLSEN MH, BØJE CR, KJÆR TK, STEDING-JESSEN M, JOHANSEN C, OVERGAARD J, et al. Socioeconomic position and stage at diagnosis of head and neck cancer - A nationwide study from DAHANCA. *Acta Oncologica* 2015; 54(5): 759–766.

[35] MAIA LL, PETERLE GT, DOS SANTOS M, TRIVILIN LO, MENDES SO, DE OLIVEIRA MM, et al. JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2018 Mar 28;13(3):e0194884.

[36] ZUNZUNEGUI MV, ALVARADO BE, BÉLAND F, VISSANDJEE B. Explaining health differences between men and women in later life: a cross-city comparison in Latin America and the Caribbean. *Social Science and Medicine* 2009; 68:235–242.

[37] Surveillance epidemiology and end results (SEER). *Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer 2011-2015* [<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>]. National Cancer Institute.

[38] INCA. *Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

[39] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies*. Geneva: World Health Organization; 2017.

[40] SZYMAŃSKA K, HUNG RJ, WÜNSCH-FILHO V, ELUF-NETO J, CURADO MP, KOIFMAN S, et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2011 Jul;22(7):1037-46.

[41] ZHENG CM, GE MH, ZHANG SS, TAN Z, WANG P, ZHENG RS, et al. Oral cavity cancer incidence and mortality in China, 2010. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2015 Oct;11 Suppl 2:C149-54.

[42] FARSHADPOUR F, KRANENBORG H, CALKOEN EV, HORDIJK GJ, KOOLE R, SLOOTWEG PJ, TERHAARD CH. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: influence of smoking and drinking. *Head and Neck* 2011 Jun;33(6):817-23.

- [43] VAN IMHOFF LC, KRANENBURG GG, MACCO S, NIJMAN NL, VAN OVERBEEKE EJ, WEGNER I. Prognostic value of continued smoking on survival and recurrence rates in patients with head and neck cancer: A systematic review. *Head and Neck* 2016 Apr;38 Suppl 1:E2214-20.
- [44] ACHMAD RT, BUDIAWAN, AUERKARI EI. Effects of Chromium on Human Body. *Annual Research & Review in Biology* 2017; 13(2): 1-8.
- [45] PECHOVA A, PAVLATA L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina* 2007; 52(1): 1–18.
- [46] PREVARSKAYA N, SKRYMA R, SHUBA Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2010 Mar;16(3):107-21.
- [47] CUDDAPAH VA, SONTHEIMER H. Molecular interaction and functional regulation of CIC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2010 Apr 9;285(15):11188-96.
- [48] CHEN F, DING M, CASTRANOVA V, SHI X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001 Jun;222(1-2):159-71.
- [49] SUH KS, YUSPA SH. Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design* 2005;11(21):2753-64.
- [50] WEBB SD, SHERRATT JA, FISH RG. Modelling tumour acidity and invasion. *Novartis Found Symp* 2001; 240: 169-81.
- [51] HRYCIW DH, WANG Y, DEVUYST O, POLLOCK CA, PORONNIK P, GUGGINO WB. Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem* 2003; 278: 40169-76.
- [52] BOSL MR, STEIN V, HUBNER C, ZDEBIK AA, JORDT SE, MUKHOPADHYAY AK, et al. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption. *EMBO J* 2001; 20:1289-99.
- [53] BERRYMAN MA, GOLDENRING JR. CLIC4 is enriched at cell-cell junctions and colocalizes with AKAP350 at the centrosome and midbody of cultured mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003; 56: 159-72.

**Supplementary table 1. Elemental characterization of oral cavity squamous cell carcinoma samples according to patients' smoking habits.**

(to be continued)

Element	Smoking Habit						<i>P</i> <i>value</i>	History of Tobacco Consumption				<i>P</i> <i>value</i>	Current Tobacco Consumption				<i>P</i> <i>value</i>
	Never		Stoppet		Current			No		Yes			No		Yes		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)	
<b>Magnesium</b>																	
Absent	14	100.00	15	65.22	40	97.56	<b>0.000</b>	12	85.71	57	89.06	0.722	31	83.78	38	92.68	0.191
Present	0	0.00	8	34.78	1	2.44		2	14.29	7	10.94		6	16.22	3	7.32	
<b>Phosphorus</b>																	
Absent	1	7.14	1	4.35	3	7.32	0.891	2	14.29	3	4.69	0.184	2	5.41	3	7.32	0.549
Present	13	92.86	22	95.65	38	92.68		12	85.71	61	95.31		35	94.59	38	92.68	
<b>Sulfur</b>																	
Absent	0	0.00	1	4.35	0	0.00	0.298	0	0.00	1	1.56	0.638	1	2.70	0	0.00	0.474
Present	14	100.00	22	95.65	41	100.00		14	100.00	63	98.44		36	97.30	41	100.00	
<b>Chlorine</b>																	
Absent	12	85.71	14	60.87	24	58.54	0.174	11	78.57	39	60.94	0.213	28	75.68	22	53.66	<b>0.043</b>
Present	2	14.29	9	39.13	17	41.46		3	21.43	28	39.06		9	24.32	19	46.34	
<b>Potassium</b>																	
Absent	4	28.57	3	13.04	7	17.07	0.480	5	35.71	9	14.06	0.056	8	21.62	6	14.63	0.422
Present	10	71.43	20	86.96	34	82.96		9	64.29	55	85.94		29	78.38	35	85.37	
<b>Calcium</b>																	
Absent	1	7.14	0	0.00	0	0.00	0.099	1	7.14	0	0.00	0.179	1	2.70	0	0.00	0.474
Present	13	92.86	23	100.00	41	100.00		13	92.86	64	100.00		36	97.30	41	100.00	
<b>Chromium</b>																	
Absent	13	92.86	9	39.13	23	56.10	<b>0.006</b>	13	92.86	32	50.00	<b>0.003</b>	24	64.86	21	51.22	0.223
Present	1	7.14	14	60.87	18	43.90		1	7.14	32	50.00		13	35.14	20	48.78	
<b>Manganese</b>																	
Absent	14	100.00	10	43.48	28	68.29	<b>0.002</b>	12	85.71	40	66.67	0.095	26	70.27	26	63.41	0.521
Present	0	0.00	13	56.52	13	31.71		2	14.29	26	33.33		11	29.73	15	36.59	
<b>Iron</b>																	
Absent	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1.000	0	0.00	0	0.00	1.000	0	0.00	0	0.00	1.000
Present	14	100.00	23	100.00	41	100.00		14	100.00	64	100.00		37	100.00	41	100.00	

**Supplementary table 1.** Elemental characterization of oral cavity squamous cell carcinoma samples according to patients' smoking habits.

Element	Smoking Habit						P value	History of Tobacco Consumption				P value	Current Tobacco Consumption				P value
	Never		Stoppet		Current			No		Yes			No		Yes		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)	
<b>Cobalt</b>																	
Absent	12	85.71	18	78.26	39	95.12	0.121	10	71.43	59	92.19	0.050	32	86.49	37	88.46	0.433
Present	2	14.29	5	21.74	2	4.88		4	28.57	5	7.81		5	13.51	4	11.54	
<b>Nickel</b>																	
Absent	14	100.00	20	86.96	33	80.49	0.191	13	92.86	54	84.38	0.409	36	97.30	31	75.61	<b>0.005</b>
Present	0	0.00	3	13.04	8	19.51		1	7.14	10	15.63		1	2.70	10	24.39	
<b>Copper</b>																	
Absent	1	7.14	1	4.35	2	4.88	0.927	1	7.14	3	4.69	0.706	2	5.41	2	4.88	0.652
Present	13	92.86	22	95.65	39	95.12		13	92.96	61	95.31		35	94.59	39	95.12	
<b>Zinc</b>																	
Absent	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1.000	0	0.00	0	0.00	1.000	0	0.00	0	0.00	1.000
Present	14	100.00	23	100.00	41	100.00		14	100.00	64	100.00		37	100.00	41	100.00	
<b>Arsenic</b>																	
Absent	9	64.29	4	17.39	12	29.27	<b>0.011</b>	8	57.14	17	26.56	<b>0.026</b>	14	37.84	11	26.83	0.298
Present	5	35.71	19	82.61	29	70.73		6	42.86	47	73.44		23	62.16	30	73.17	
<b>Bromine</b>																	
Absent	9	64.29	4	17.39	12	29.27	<b>0.011</b>	8	57.14	17	26.56	<b>0.026</b>	14	37.84	11	26.83	0.298
Present	5	35.71	19	82.61	29	70.73		6	42.86	47	73.44		23	62.16	30	73.17	
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>100.0</b>	<b>23</b>	<b>100.0</b>	<b>41</b>	<b>100.0</b>		<b>14</b>	<b>100.0</b>	<b>64</b>	<b>100.0</b>		<b>37</b>	<b>100.0</b>	<b>41</b>	<b>100.0</b>	

**Supplementary table 2. Elemental characterization versus prognostic characteristics**

Element	Recurrence				<i>P value</i>	Death				<i>P value</i>
	No		Yes			No		Yes		
	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)	
<b>Magnesium</b>										
Absent	54	85.7	15	100.0	0.129	44	89.8	25	86.2	0.446
Present	9	14.3	0	0.0		5	10.2	4	13.8	
<b>Phosphorus</b>										
Absent	4	6.3	1	6.7	0.620	5	10.2	0	0.0	0.090
Present	59	93.7	14	93.3		44	89.8	29	100.0	
<b>Sulfur</b>										
Absent	1	1.6	0	0.0	0.807	1	2.0	0	0.0	0.628
Present	62	98.4	15	100.0		48	98.0	29	100.0	
<b>Chlorine</b>										
Absent	37	58.7	13	86.7	<b>0.037</b>	31	63.3	19	65.5	0.841
Present	26	41.3	2	13.3		18	36.7	10	34.5	
<b>Potassium</b>										
Absent	11	17.5	3	20.0	0.532	8	16.3	6	20.7	0.627
Present	52	82.5	12	80.0		41	83.7	23	79.3	
<b>Calcium</b>										
Absent	1	1.6	0	0.0	0.807	1	2.0	0	0.0	0.628
Present	62	98.4	15	100.0		48	98.0	29	100.0	
<b>Chromium</b>										
Absent	40	63.5	5	33.3	<b>0.034</b>	39	59.2	16	55.2	0.729
Present	23	36.5	10	66.7		20	40.8	13	44.8	
<b>Manganese</b>										
Absent	45	71.4	7	46.7	0.067	35	71.4	17	58.6	0.246
Present	18	28.6	8	53.3		14	28.6	12	41.4	
<b>Iron</b>										
Absent	0	0.0	0	0.0	1.000	0	0.0	0	0.0	1.000
Present	63	100.0	15	100.0		49	100.0	29	100.0	
<b>Cobalt</b>										
Absent	54	85.7	15	100.0	0.129	43	87.8	26	89.7	0.554
Present	9	14.3	0	0.0		6	12.2	3	10.3	
<b>Nickel</b>										
Absent	54	85.7	13	86.7	0.645	41	83.7	26	89.7	0.353
Present	9	14.3	2	13.3		8	16.3	3	10.3	
<b>Copper</b>										
Absent	3	4.8	1	6.7	0.561	4	8.2	0	0.0	0.149
Present	60	95.2	14	93.3		44	91.8	29	100.0	
<b>Zinc</b>										
Absent	0	0.0	0	0.0	1.000	0	0.0	0	0.0	1.000
Present	63	100.0	15	100.0		49	100.0	29	100.0	
<b>Arsenic</b>										
Absent	18	28.6	7	46.7	0.177	16	32.7	9	31.0	0.544
Present	45	71.4	8	53.3		33	67.3	20	69.0	
<b>Bromine</b>										
Absent	18	28.6	7	46.7	0.177	16	32.7	9	31.0	0.544
Present	45	71.4	8	53.3		33	67.3	20	69.0	
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>100.0</b>	<b>15</b>	<b>100.0</b>		<b>49</b>	<b>100.0</b>	<b>29</b>	<b>100.0</b>	

**CAPÍTULO 2: CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA  
CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO ENTRE HIF-1 $\alpha$ , PHD3, PERFIL  
ELEMENTAR QUÍMICO, PROGNÓSTICO E SOBREVIDA**

Artigo a ser submetido: Plos One

## CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO ENTRE HIF-1 $\alpha$ , PHD3, PERFIL ELEMENTAR QUÍMICO, PROGNÓSTICO E SOBREVIDA

### RESUMO

A correlação entre os elementos traços e o processo de carcinogênese, deve-se ao potencial citotóxico de alguns destes quando disponíveis em concentrações excedentes. Somado a este, estudos recentes descreveram a associação destes elementos com a regulação de vias relacionadas a progressão tumoral e com o prognóstico a ser observado, dentre essas vias está a via da hipóxia que tem o seu principal regulador a HIF1. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar a associação dos hábitos tabagista e etilista e da caracterização elementar na expressão das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3, assim como a relação com o prognóstico e a sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral. Foram obtidas 78 amostras carcinoma de células escamosas de cavidade oral, juntamente com as amostras foram obtidas informações clinicopatológicas, de estilo de vida e acompanhamento clínico. Das amostras foram confeccionados *tissue microarrays*, os quais foram submetidas a análise por  $\mu$ XRF, para a caracterização elementar e análise de imuno-histoquímica para verificar a expressão das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3. Foi verificada a expressão nuclear de HIF-1 $\alpha$  em 68 amostras e de HIF-1 $\alpha$  citoplasmática em 71 amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral. A expressão nuclear de PHD3 foi observada em 49 amostras e de PHD3 citoplasmática em 48 amostras. Foi verificada ainda a relação do tamanho tumoral com a intensidade de marcação da HIF-1 $\alpha$  nuclear e positividade da expressão de PHD3 citoplasmática com o estadio clínico avançado. Verificou-se também que os tumores T3/T4 e a presença de cloro aumentam as chances de apresentarem expressão forte de HIF-1 $\alpha$  citoplasmática e que o estadio clínico, o consumo atual de álcool e a presença do elemento cromo influenciam na expressão da PHD3. Para as sobrevidas, foi observado a associação da sobrevida livre de doença com o *status* linfonodal, ao passo que a sobrevida doença-específica foi associada ao *status* linfonodal e ao estadio clínico avançado. Com o presente trabalho foi possível concluir que existe uma associação do tamanho tumoral e da presença de cloro com intensidade expressão citoplasmática de HIF-1 $\alpha$ , bem como a associação estadio clínico avançado e do consumo atual de álcool na positividade

de expressão citoplasmática de PHD3 e da presença de cromo com a intensidade de expressão citoplasmática da mesma proteína. Conclui-se também que o status linfonodal e o estadió clínico são importantes no prognóstico e sobrevida dos pacientes. Esse estudo apresenta dados inéditos sobre o perfil elementar, os hábitos e a expressão de HIF-1 $\alpha$  e PHD3 com os fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

**Palavras-chave:** Câncer oral; caracterização elementar; hábito tabagista; etilismo; anti-HIF-1 $\alpha$ ; anti-PHD3; sobrevivência.

## INTRODUÇÃO

Elementos traços definem-se como elementos inorgânicos, disponíveis em baixas concentrações, e que participam de mecanismos bioquímicos que garantem a homeostase biológica (MAJEWSKA et al., 1997). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estes dividem-se em três grupos que são: elementos essenciais, elementos provavelmente essenciais e elementos potencialmente tóxicos (WHO, 1996).

A correlação entre os elementos traços e o processo de carcinogênese, deve-se ao potencial citotóxico de alguns destes quando disponíveis em concentrações excedentes (MAJEWSKA et al., 1997). Como exemplo descrito na literatura tem-se o níquel que pode atuar no silenciamento gênico, por mecanismos epigenéticos e pela substituição do núcleo metálico de algumas proteínas, como as da família das dioxigenases Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependente, que alteram então sua atividade e prejudicando a homeostase do organismo (CHEN et al., 2001; CRUZ et al., 2004; GOLEBIEWSKI; KASPRZAK, 2005; SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

Estudos recentes descreveram a associação dos elementos traços com a regulação de vias relacionadas a progressão tumoral e com o prognóstico a ser observado (FINNEY et al., 2009), nesse sentido, os elementos traços podem relacionar-se com a ativação e silenciamento de genes que controlam a proliferação celular como, por exemplo, os de hipóxia. A proteção contra hipóxia em tumores é um passo importante no desenvolvimento e progressão tumoral, com ativação do complexo transcricional *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), que sob as condições de hipóxia tumoral, promove a transcrição de mais de 100 genes que atuam em mecanismos específicos para evitar a morte celular (KOH et al., 2010).

O complexo HIF-1 é um fator de transcrição composto por uma subunidade - alpha e uma subunidade - beta: sob condições de hipóxia, a subunidade HIF1 $\alpha$  é estabilizada e translocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF1 $\beta$ , também conhecida como ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, que se associa com coativadores transcricionais e promove a expressão de genes envolvidos em processos do metabolismo celular, crescimento, apoptose, angiogênese, metástase, dentre outros protagonistas da adaptação à baixa oxigenação. O nível intracelular de HIF1 $\alpha$  é regulado principalmente pela

estabilidade da proteína. Sob condições de normóxia, a HIF1 $\alpha$  é constantemente sintetizada, mas é rapidamente degradada após sofrer modificação pós traducional pelas prolin hidroxilases (PHDs). A hidroxilação da prolina na HIF1 $\alpha$  resulta na ligação da proteína von Hippel-Lindau e consequente ubiquitinação e degradação proteossomal, enquanto torna-se estável e ativa sob condições de hipóxia (STOLZE et al., 2006).

A hipóxia é encontrada em diferentes graus na maioria dos tumores sólidos, que contêm regiões hipóxicas devido a alterações estruturais ou quantitativas nos vasos. No carcinoma epidermoide de cavidade oral, hipóxia e densidade vascular reduzida estão relacionadas a um pior prognóstico e são responsáveis pela resistência à quimioterapia e radioterapia (SCHÖDER et al., 2009). Células hipóxicas requerem de 2,5-3 vezes a dose de radiação para produzirem o mesmo nível de apoptose do que as células óxicas. Além disso, células que sobrevivem ao severo estresse hipóxico adquirem resistência a diversas alterações fisiológicas e não fisiológicas, incluindo rádio e quimioterapia (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a associação dos hábitos tabagista e etilista e da caracterização elementar na expressão das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3, assim como a relação com o prognóstico e a sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Casuística e amostras*

Foram obtidas amostras do Projeto Genoma de Cabeça e Pescoço (GENCAPO), um grupo multi-institucional e multidisciplinar, atuante desde 2002 na coleta de dados clínicos e epidemiológicos, além de amostras tumorais de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Neste estudo, foram obtidas 78 amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral, tratados cirurgicamente no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho (ICAVC), São Paulo, Brasil, durante o período de janeiro/2012 a maio/2015. As amostras foram utilizadas para análise elementar química e para avaliar a expressão das proteínas HIF-1 $\alpha$  e PHD3. Todos

os casos têm confirmação histológica por meio de nova análise histopatológica e do diagnóstico, com seguimento mínimo de 24 meses a partir do tratamento inicial, realizado de acordo com a rotina estabelecida pelo Serviço de Anatomia Patológica do ICAVC.

Para a uniformidade da casuística, foram excluídos os casos com tratamento prévio à cirurgia e com metástase à distância. Foram retirados os casos sem informações relevantes para o estudo ou representatividade das amostras para a análise histopatológica e imuno-histoquímica. Juntamente com as amostras tumorais em blocos de parafina, foram obtidas informações quanto ao estilo de vida, hábitos alimentares, de tabagismo e etilismo, além de informações clínicas referente a modalidade de tratamento e laudo anatomopatológico.

As amostras foram categorizadas de acordo com o hábito tabagista, sendo: nunca fumou, parou de fumar e fuma atualmente.

#### *Tissue microarrays*

Os *tissue microarrays* (TMA) foram confeccionados usando seções fixadas em formalina tamponada a 10% e embebidas em parafina de 78 carcinomas de células escamosas primários de cavidade oral de pacientes tratados cirurgicamente no ICAVC, seguindo metodologia descrita por Cajaiba et al., 2006. A seleção das duas áreas tumorais representativas, foi realizada por dois patologistas experientes a partir de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Dois cilindros de 1,5 mm de diâmetro foram perfurados de cada amostra e reintroduzidos em blocos de parafina receptores usando um *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, MD, EUA). As seções de 3 µm de espessura foram então retiradas do TMA, montadas em lâminas de microscopia. Um patologista verificou o conteúdo de cada *spot*. Os *spots* dobrados ou com ausência de mais de 70% do tecido foram excluídos. Ao final não foi possível avaliar três amostras para a proteína HIF1-α e cinco amostras para a proteína PHD3, sendo que dessas cinco, três eram as mesmas que não foram avaliadas para HIF1-α.

### *Caracterização elementar*

Após a retirada das secções histológicas, os cilindros de tecido tumoral foram retirados dos TMA e passaram pelo processo de desparafinização e reidratação, com xileno e álcool, respectivamente.

As amostras, com espessura média de 450  $\mu\text{m}$  e densidade de 0,54  $\text{g}/\text{cm}^3$ , foram dispostas em suporte plásticos com filme de Ultralene® e levadas aos equipamentos da linha de luz D09-XRF. Para aquisição dos espectros, utilizou-se um feixe branco com faixa de energia de 4 a 24 keV e dimensões de 2  $\text{mm}^2$  para excitar as amostras durante 20 segundos. Os raios X fluorescentes emitidos pelas amostras foram detectados utilizando um espectrômetro de alta resolução, baseado em um detector *Silicon Drift* com janela de berílio de 8  $\mu\text{m}$  de espessura e área ativa de 7  $\text{mm}^2$ . Utilizou-se um filtro de alumínio de 45  $\mu\text{m}$  no feixe e o suporte com a amostra foi posicionado numa distância de 21mm e num ângulo de 45° em relação ao detector. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente e pressão normal.

Foram realizadas nove medidas em uma matriz de 3x3 e realizada uma média para obtenção do espectro final utilizado nas análises. Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos, determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes, foi realizada uma análise de uma amostra de referência certificada, *Standard Reference Material*® 1577b “*Bovine Liver*”, produzida pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST), sob as mesmas condições das amostras teste, o programa computacional PyMca 5.0.0 (SOLÉ et al., 2007) foi a base para as análises.

As medidas de  $\mu\text{XRF}$  foram realizadas na linha de luz de Fluorescência de Raios-X D09-XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo, Brasil (Pérez et al., 1999).

### *Reação de imuno-histoquímica*

As lâminas de TMA foram submetidas à reação de imuno-histoquímica na qual foi utilizado o Kit da Spring Bioscience® (California, Estados Unidos, PMB1-250). Inicialmente as lâminas foram hidratadas na bateria de xilol e álcool. Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução de recuperação antigênica 3 em 1 pH 6 em banho maria, em temperatura de 98°C por 45 minutos. Após este tempo

foram deixadas em solução de EDTA (1mM, pH 8 - 9) por 10 minutos para bloqueio da reação de recuperação antigênica. Em seguida foi feito o bloqueio de peroxidase por 15 minutos por meio da utilização de uma câmara úmida. Novamente foram imersas em solução de EDTA por 5 minutos, processo este repetido por mais três vezes. Em seguida, procedeu-se o bloqueio de proteína por 15 minutos através da solução de bloqueio do kit. Após o bloqueio foi aplicado o anticorpo de interesse diluído em diluente de anticorpo e deixado sobre a lâmina em média por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados no estudo e suas referidas diluições

Produto	Descrição	Diluição	Imunógeno
Anticorpo anti-HIF-1 alpha [ESEE122] (ab8366 - Abcam®)	Mouse monoclonal	1/1600	HIF-1 alpha humano (aa 300-550)
Anticorpo anti-PHD3 (ab30782 -Abcam®)	Rabbit polyclonal	1/800	PHD3/prolil hidroxilase humana

Após a incubação com os anticorpos primários diluídos, conforme apresentado na tabela 1, as lâminas foram imersas em solução de EDTA por 5 minutos, etapa repetida por mais duas vezes e em seguida foi aplicada a solução de complemento por 10 minutos. Posteriormente, foi aplicada a solução de conjugado HRP que foi deixada por 15 minutos sobre a lâmina. As lâminas foram novamente imersas em solução de EDTA por 5 minutos, processo repetido por mais três vezes. Logo após, as lâminas foram submetidas por 10 minutos ao cromógeno DAB Plus diluído 1/50 em solução diluente de DAB e em seguida lavadas com água destilada, coradas com hematoxilina por 5 minutos e desidratadas na bateria de xilol e álcool. Ao final de todas as etapas foi fixada a lamínula com resina.

#### *Avaliação da expressão por microscopia ótica*

A análise da lâmina foi feita utilizando microscópio óptico Zeiss® em aumento de 100x e 400x. A expressão das proteínas foi avaliada por dois analisadores diferentes de forma independente, sendo reanalisados os casos conflitantes.

A análise para cada proteína foi semiquantitativa, sendo as amostras classificadas segundo o percentual de células coradas em: 0 (0% de células

marcadas), 1 (<10%); 2 ( $10 \leq 50\%$ ) e 3 (>50% de células marcadas); e pela intensidade de coloração em: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte).

As pontuações recebidas na classificação do percentual de células coradas e da intensidade de coloração foram multiplicadas e calculadas as suas médias para cada amostra. Posteriormente, com base no score final, cada amostra foi categorizada como expressão negativa (0), positiva fraca ( $1 \leq 3$ ) ou positiva forte (>3), seguindo a metodologia utilizada por trabalhos que fizeram análises semelhantes ao presente estudo (SOINI *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2013).

### *Análise estatística*

Para os testes de associação foram utilizados o teste Qui-quadrado em análise bivariada e, quando necessário, o teste exato de Fisher.

A regressão logística multivariada por modelagem foi utilizada para ajustar os valores do *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança (IC 95%). Para este teste, foram consideradas estaticamente significantes aquelas variáveis que apresentaram o valor de  $p < 0,05$ . Entretanto, para a realização da regressão logística multivariada por modelagem foram selecionadas todas aquelas características que obtiveram  $p < 0,20$  quando testada diante a característica em questão, em análise bivariada. Ressalto que após a realização da análise multivariada por modelagem apenas as características com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

Para a análise da sobrevida foi calculado o intervalo de tempo (em meses) entre as datas de cirurgia e óbito de cada paciente ou do último retorno nos casos de sobreviventes. Entretanto, o intervalo de tempo para a análise de sobrevida livre de doença foi calculado utilizando como ponto final a data de recidiva geral, respectivamente, ou a data do último retorno nos casos assintomáticos. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier e o valor de  $p$  de Wilcoxon.

Posteriormente, o modelo Cox Proportional Hazards foi utilizado ajustar os valores do *hazards ratio* (HR) e o intervalo de confiança (IC 95%), considerando as variáveis estatisticamente significantes aquelas com  $p < 0,05$ . Entretanto, para a

realização da regressão logística multivariada por modelagem foram selecionadas todas aquelas características que obtiveram  $p < 0,20$  quando testada diante a característica em questão, em análise bivariada. Os cálculos matemáticos foram realizados com a utilização do programa IBM SPSS STATISTICS® v. 20, 2011.

### *Aspectos éticos*

O estudo possui aprovação nos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, sob parecer número 1.359.363 e do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, sob parecer número 1.422.077.

Os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço e para o presente estudo foi dispensada a assinatura do TCLE.

## **RESULTADOS**

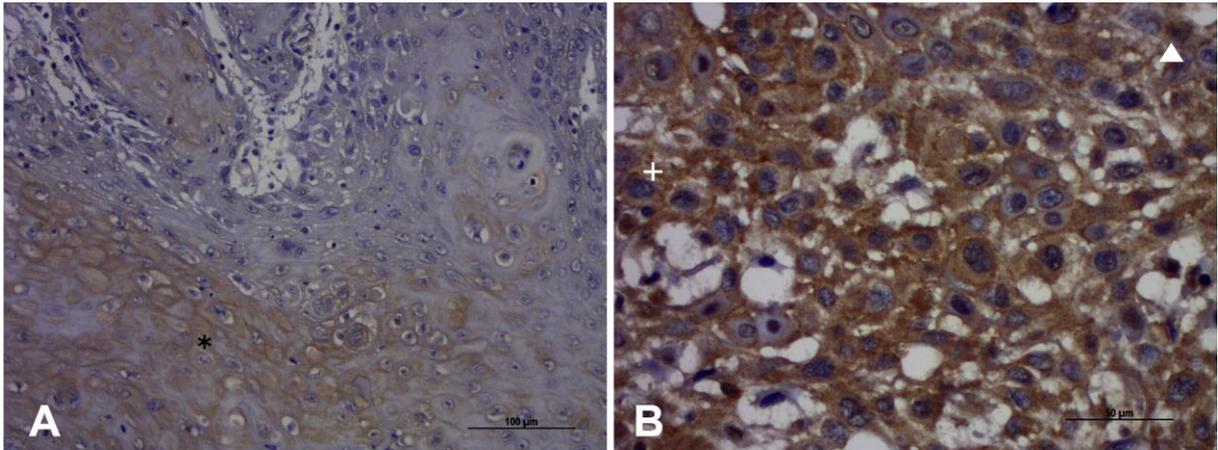
### *Expressão das proteínas*

Os resultados das expressões das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3 de amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, podem ser observados na tabela 2.

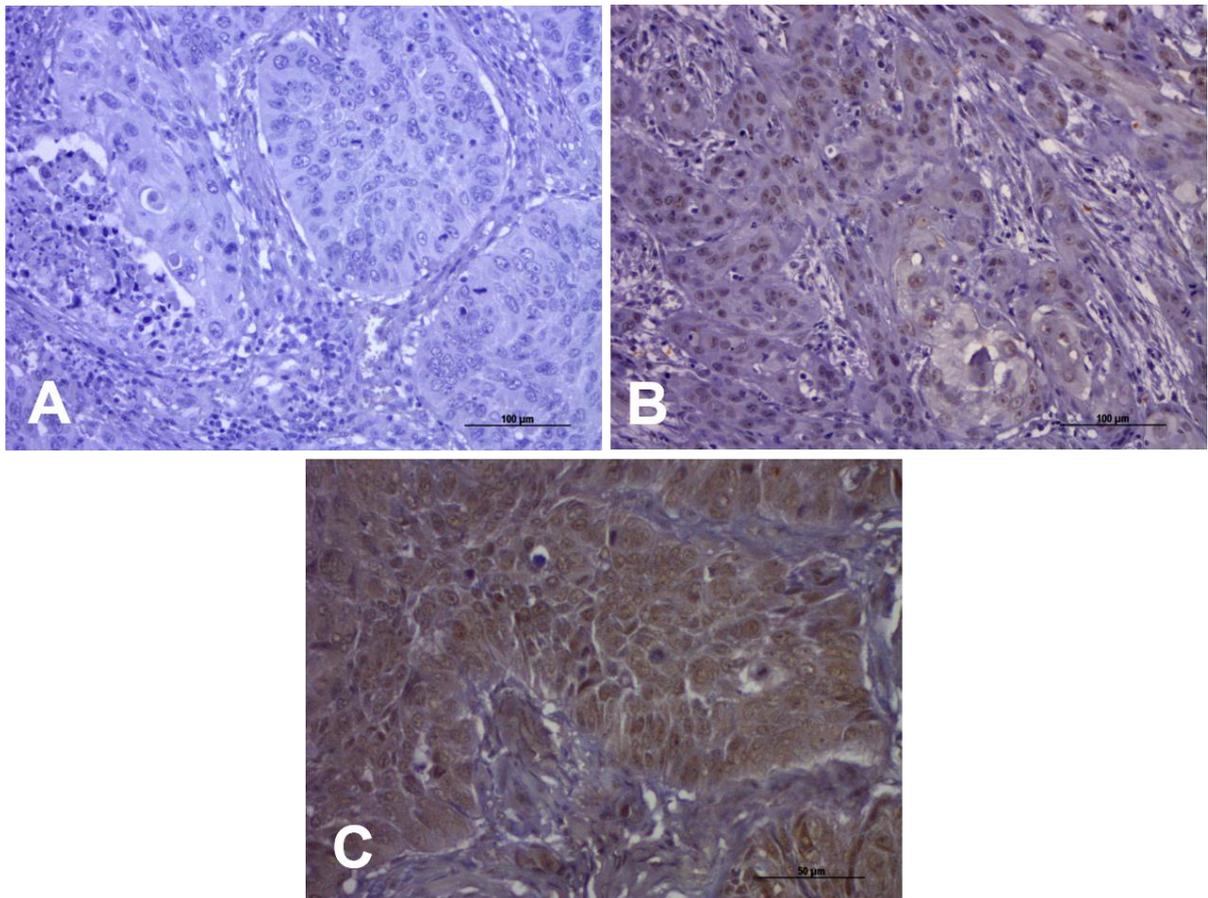
Na figura 1 é possível observar os padrões de expressão da proteína HIF1- $\alpha$  e na figura 2 os padrões de expressão de PHD3 em amostras de carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

**Tabela 2.** Distribuição das expressões das proteínas HIF1- $\alpha$  e PHD3 de amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

Proteína	Positividade				Intensidade			
	Negativa		Positiva		Fraca		Forte	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
HIF1- $\alpha$ nuclear	7	9,3	68	90,7	26	38,2	42	61,8
HIF1- $\alpha$ citoplasmática	4	5,3	71	94,7	26	36,6	45	63,4
PHD3 nuclear	24	32,9	49	67,1	32	65,3	17	34,7
PHD3 citoplasmática	25	34,2	48	65,8	34	69,4	14	30,6



**Figura 1.** Fotomicrografia da expressão da proteína HIF1- $\alpha$  em carcinoma de células escamosas de cavidade oral. (A) Imunomarcacão citoplasmática de intensidade fraca (\*). (B) Imunomarcacão citoplasmática de intensidade forte (+) e nuclear de intensidade forte (cabeça de seta). Barras: 100  $\mu$ m (A) e 50  $\mu$ m (B).



**Figura 3.** Fotomicrografia da expressão da proteína PHD3 em carcinoma de células escamosas de cavidade oral. (A) Amostra negativa para expressão de PHD3. (B) Imunomarcacão citoplasmática de intensidade fraca e nuclear de intensidade forte. (C) Imunomarcacão citoplasmática e nuclear de intensidade forte. Barras: 100  $\mu$ m (A; B) e 50  $\mu$ m (C).

### Características clinicopatológicas e o padrão de expressão

A relação da expressão nuclear de HIF1- $\alpha$  com as características clinicopatológicas, revelou uma associação da intensidade de marcação com o tamanho tumoral, tanto na categorização em pT1, pT2, pT3 e pT4 ( $p = 0.047$ ) quanto na categorização agrupada em pT1/pT2 e pT3/pT4 ( $p = 0.021$ ). No qual a maioria dos indivíduos com marcação nuclear forte eram pT3 e pT4 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  no núcleo com as características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	Positividade				<i>p</i>	Intensidade				<i>p</i>
	Negativa		Positiva			Fraca		Forte		
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Tamanho do tumor</b>										
T1	2	9,1	20	90,9	0,166	9	45,0	11	55,0	<b>0,047</b>
T2	4	21,1	15	78,9		9	60,0	6	40,0	
T3	1	5,9	16	94,1		2	12,5	14	87,5	
T4	0	0,0	17	100,0		6	35,3	11	64,7	
<b>Tamanho do tumor</b>										
pT1, pT2	6	14,6	35	85,4	0,088	18	51,4	17	48,6	<b>0,021</b>
pT4, pT4	1	2,9	33	97,1		8	24,2	25	75,8	
<b>Linfonodos</b>										
Negativo	6	12,2	43	87,8	0,226	20	46,5	6	24,0	0,065
Positivo	1	3,8	25	96,2		23	53,5	19	76,0	
<b>Estádio</b>										
I	0	0	0	0	0,104	0	0	0	0	0,259
II	1	11,1	8	88,9		4	50,0	4	50,0	
III	3	21,4	11	78,6		6	54,5	5	45,5	
IV	2	4,0	48	96,0		15	31,3	33	68,8	
<b>Estádio</b>										
I, II, III	4	17,4	19	82,6	0,074	10	52,6	9	47,4	0,103
IV	2	4,0	48	96,0		15	31,3	33	68,9	
<b>Agressividade Tumoral</b>										
Pouco agressivo	6	12,2	43	87,8	0,226	20	46,5	23	53,5	0,065
Bem agressivo	1	3,8	25	96,2		6	24,0	19	76,0	
<b>Grau de diferenciação</b>										
Bem	1	9,1	10	90,9	0,860	4	40,0	6	60,0	0,066
Moderadamente	4	6,9	54	93,1		18	33,3	36	66,7	
Pouco	0	0,0	3	100,0		3	100,0	0	0,0	

Para a expressão citoplasmática de HIF1- $\alpha$ , foi possível observar uma associação do tamanho tumoral ( $p = 0.003$ ), no estágio clínico ( $p = 0.014$ ) e no grau

de diferenciação ( $p = 0.031$ ), nos quais a maioria dos indivíduos eram pT3/pT4, estágio clínico IV e grau de diferenciação moderado (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  no citoplasma com as características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	Positividade				<i>p</i>	Intensidade				<i>p</i>
	Negativa		Positiva			Fraca		Forte		
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Tamanho do tumor</b>										
T1	0	0,0	22	100,0	0,097	11	50,0	11	50,0	<b>0,003</b>
T2	3	15,8	16	84,2		9	56,3	7	43,8	
T3	1	5,9	16	94,1		0	0,0	16	100,0	
T4	0	0,0	17	100,0		6	35,3	11	64,7	
<b>Tamanho do tumor</b>										
pT1, pT2	3	7,3	38	92,7	0,382	20	52,6	18	47,4	<b>0,003</b>
pT4, pT4	1	2,9	33	97,1		6	18,2	27	81,2	
<b>Linfonodos</b>										
Negativo	4	8,2	45	91,8	0,174	20	44,4	25	55,6	0,072
Positivo	0	0,0	26	100,0		6	23,1	20	76,9	
<b>Estádio</b>										
I	0	0	0	0	0,099	0	0	0	0	<b>0,049</b>
II	0	0,0	9	100,0		5	55,6	4	44,4	
III	2	14,3	12	85,7		7	58,3	5	41,7	
IV	1	2,0	49	98,0						
<b>Estádio</b>										
I, II, III	2	8,7	21	91,3	0,232	12	57,1	9	42,9	<b>0,014</b>
IV	1	2,0	49	98,0		13	26,5	36	73,5	
<b>Agressividade Tumoral</b>										
Pouco agressivo	4	8,2	45	91,8	0,174	20	44,4	25	55,6	0,072
Bem agressivo	0	0,0	26	100,0		6	23,1	20	76,9	
<b>Grau de diferenciação</b>										
Bem	0	0,0	11	100,0	0,685	5	45,5	6	54,5	<b>0,031</b>
Moderadamente	3	5,2	55	94,8		16	29,1	39	70,9	
Pouco	0	0,0	3	100,0		3	100,0	0	0,0	

Não foram observadas associações significativas da expressão nuclear de PHD3 com nenhuma das características clinicopatológicas estudadas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise bivariada da expressão PHD3 no núcleo com as características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	Positividade				p	Intensidade				p
	Negativa		Positiva			Fraca		Forte		
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Tamanho do tumor</b>										
T1	9	39,1	14	60,9	0,802	8	57,1	6	42,9	0,178
T2	5	29,4	12	70,6		7	58,3	5	41,7	
T3	4	25,0	12	75,0		11	91,7	1	8,3	
T4	6	35,3	11	64,7		6	54,5	5	45,5	
<b>Tamanho do tumor</b>										
pT1, pT2	14	35,0	26	65,0	0,671	15	57,7	11	42,3	0,234
pT4, pT4	10	30,3	23	69,7		17	73,9	6	26,1	
<b>Linfonodos</b>										
Negativo	16	32,7	33	67,3	0,954	20	60,6	13	39,4	0,253
Positivo	8	33,3	16	66,7		12	75,0	4	25,0	
<b>Estádio</b>										
I	0	0	0	0	0,223	0	0	0	0	0,213
II	5	55,6	4	44,4		2	50,0	2	50,0	
III	3	21,4	11	78,6		5	45,5	6	54,5	
IV	15	31,3	33	68,8		24	72,7	9	27,3	
<b>Estádio</b>										
I, II, III	8	34,8	15	65,2	0,766	7	46,5	8	53,3	0,080
IV	15	31,3	33	68,8		24	72,7	9	27,3	
<b>Agressividade Tumoral</b>										
Pouco agressivo	16	32,7	33	67,3	0,954	20	60,6	13	39,4	0,253
Bem agressivo	8	33,3	16	66,7		12	75,0	4	25,0	
<b>Grau de diferenciação</b>										
Bem	3	33,3	6	66,7	0,993	4	66,7	2	33,3	0,910
Moderadamente	18	31,6	39	68,4		25	64,1	14	35,9	
Pouco	1	33,3	2	66,7		1	50,0	1	50,0	

Em relação a expressão citoplasmática de PHD3, foi possível observar uma associação significativa entre a positividade com o estágio clínico ( $p = 0.012$ ). A maioria dos pacientes negativos para a PHD3 citoplasmática estavam no estágio clínico II (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise bivariada da expressão PHD3 no citoplasma com as características clinicopatológicas.

Características clinicopatológicas	Positividade					Intensidade				
	Negativa		Positiva		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Tamanho do tumor</b>										
T1	9	39,1	14	60,9	0,708	10	71,4	4	28,6	0,701
T2	7	41,2	10	58,8		8	80,0	2	20,0	
T3	4	25,0	12	75,0		9	75,0	3	25,0	
T4	5	29,4	12	70,6		7	58,3	5	41,7	
<b>Tamanho do tumor</b>										
pT1, pT2	16	40,0	24	60,0	0,254	18	75,0	6	25,0	0,525
pT4, pT4	9	27,3	24	72,7		16	66,7	8	33,3	
<b>Linfonodos</b>										
Negativo	16	32,7	33	67,3	0,682	21	63,6	12	36,4	0,097
Positivo	9	37,5	15	62,5						
<b>Estádio</b>										
I	0	0	0	0	<b>0,012</b>	0	0	0	0	0,207
II	7	77,8	2	22,2		1	50,0	1	50,0	
III	4	28,6	10	71,4		5	50,0	5	50,0	
IV	13	27,1	35	72,9		27	77,1	8	22,9	
<b>Estádio</b>										
I, II, III	11	47,8	12	52,2	0,084	6	50,0	6	50,0	0,076
IV	13	27,1	35	72,9		27	77,1	8	22,9	
<b>Agressividade Tumoral</b>										
Pouco agressivo	16	32,7	33	67,3	0,682	21	63,6	12	36,4	0,097
Bem agressivo	9	37,5	15	62,5		13	86,7	2	13,3	
<b>Grau de diferenciação</b>										
Bem	2	22,2	7	77,8	0,801	3	42,9	4	57,1	0,168
Moderadamente	19	33,3	38	66,7		28	73,7	10	26,3	
Pouco	1	33,3	2	66,7		2	100,0	0	0,0	

*Características prognósticas*

Em relação às características prognósticas foram analisados os seguintes parâmetros: recidiva geral (local + regional + à distância), recidiva local e o óbito pelo câncer. Na análise multivariada a recidiva global revelou associação significativa com o status linfonodal ( $p = 0.031$ ), o consumo atual de álcool ( $p = 0.003$ ) e a expressão citoplasmática de PHD3 ( $p = 0.005$ , Tabela 7).

De acordo com os dados obtidos a positividade citoplasmática de PHD3 aumenta o risco de o paciente apresentar recidiva em aproximadamente 18 vezes (OR = 18.486, IC = 2.40-142.12). A análise multivariada revelou ainda que o risco

dos pacientes que consomem álcool atualmente recidivarem é cerca de 12 vezes superior aos que não consomem (OR = 12.676, IC = 2.43-65.95) (Tabela 7).

Em análise por regressão logística multivariada, o óbito mostrou associação significativa com o status linfonodal ( $p = 0.002$ ) e com a positividade da proteína PHD3 citoplasmática ( $p = 0.049$ ). Segundo os dados obtidos a positividade citoplasmática de PHD3 aumenta o risco de os pacientes irem a óbito pelo câncer em cerca de 15 vezes (OR = 14.700, IC = 1.01-212.85) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise multivariada entre recidiva, óbito, status linfonodal, estágio clínico, histórico de consumo de tabaco, consumo atual de álcool e expressão de HIF1- $\alpha$  e PHD3.

Variáveis	Análise multivariada			
	Recidiva		Óbito	
	OR (CI 95%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)	<i>p</i>
<b>N (TNM)*</b>				
Negativo	1		1	
Positivo	5.883 (1.17-29.45)	<b>0.031</b>	27.54 (3.43-220.98)	<b>0.002</b>
<b>Estádio clínico</b>				
I, II e III	1			
IV	0.282 (0.04-1.65)	0.160		
<b>Histórico de consumo de tabaco</b>				
Não			1	
Sim			9.399 (0.69-128.11)	0.093
<b>Consumo atual de álcool</b>				
Não	1			
Sim	12.676 (2.43-65.95)	<b>0.003</b>		
<b>Expressão nuclear de HIF1-<math>\alpha</math></b>				
Positivo Fraco			1	
Positivo Forte			0.306 (0.05-1.83)	0.195
<b>Expressão nuclear de PHD3</b>				
Positivo Fraco			0.261 (0.03-1.89)	0.184
Positivo Forte				
<b>Expressão citoplasmática de PHD3</b>				
Negativo	1		1	
Positivo	18.486 (2.40-142.12)	<b>0.005</b>	14.700 (1.01-212.85)	<b>0.049</b>

\*Classificação TNM (7ª edição).

### Sobrevida

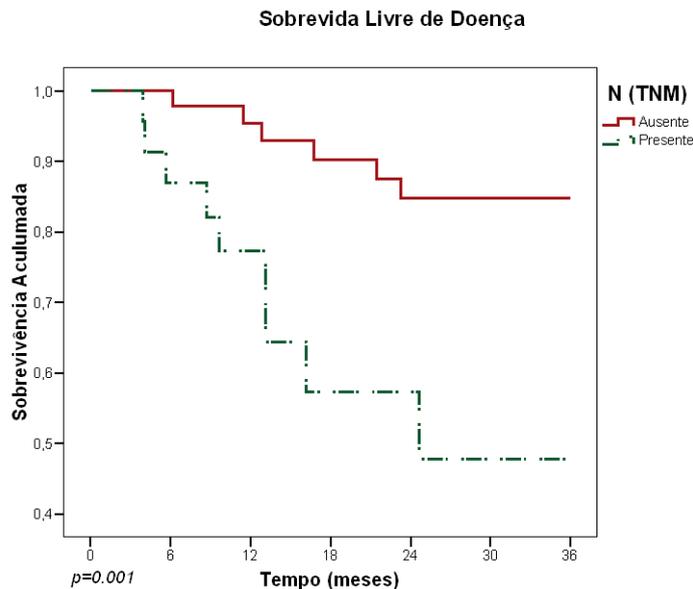
A sobrevida livre de doença esteve associada ao *status* linfonodal (Wilcoxon  $p = 0.001$ ). Nos 18 primeiros meses após o seguimento cirúrgico 10% dos pacientes com ausência de linfonodo acometido apresentaram recidiva enquanto que no mesmo período, 55% dos que tinham linfonodo acometido recidivaram. A análise multivariada revelou que a presença de linfonodo acometido é fator de risco para

uma pior sobrevida livre de doença, conferindo um risco aumentado em cerca de 5 vezes (HR = 4.950, IC = 1.68-14.57, Tabela 8, Figura 3).

**Tabela 8.** Análise multivariada entre a sobrevida livre de doença, sobrevida doença específica, status linfonodal, estágio clínico e expressão de PHD3.

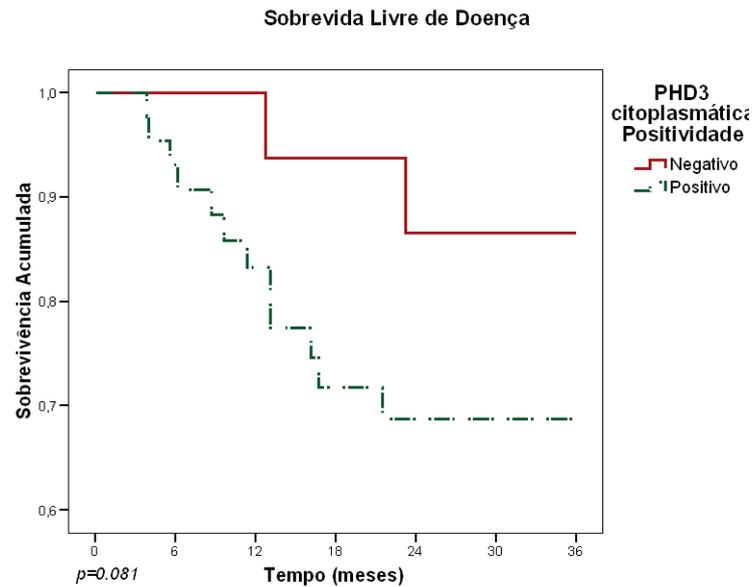
Variáveis	Cox Proporcional		Cox Proporcional	
	Sobrevida livre de doença		Sobrevida doença-específica	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
<b>N (TNM)*</b>				
Negativo	1		1	
Positivo	4.950 (1.68-14.57)	<b>0.004</b>	7.492 (2.37-23.67)	<b>0.001</b>
<b>Estádio clínico</b>				
I, II e III			1	
IV			13.545 (1.54-119,13)	<b>0.019</b>
<b>Expressão nuclear de PHD3</b>				
Positivo Fraco			1	
Positivo Forte			0.337 (0.09-1.17)	0.089
<b>Expressão citoplasmática de PHD3</b>				
Negativo	1			
Positivo	3.611 (0.80-16.19)	0.093		

\*Classificação TNM (7ª edição).



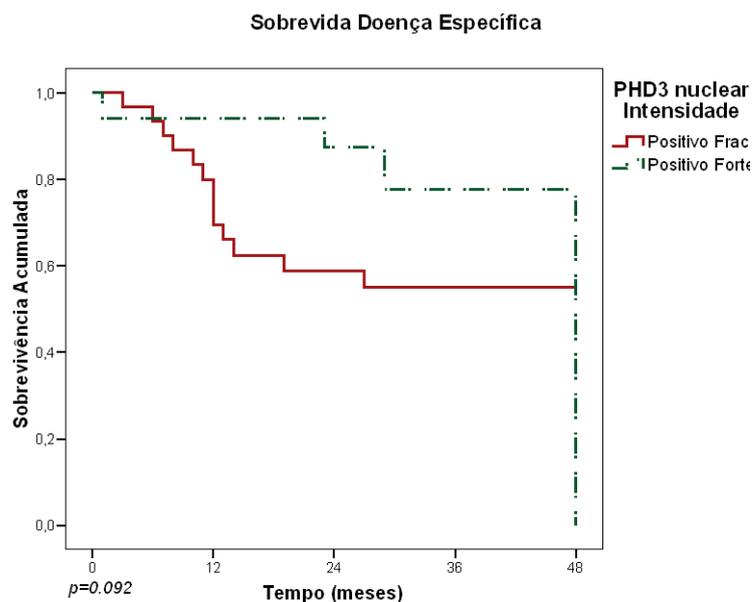
**Figura 3.** Curva de sobrevida livre de doença de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral segundo o N (TNM).

Pode-se observar que nos primeiros 18 meses após a cirurgia 5% dos pacientes negativos para expressão citoplasmática de PHD3 apresentaram recidiva enquanto 30% dos pacientes com expressão citoplasmática de PHD3 positiva recidivaram (Figura 4).



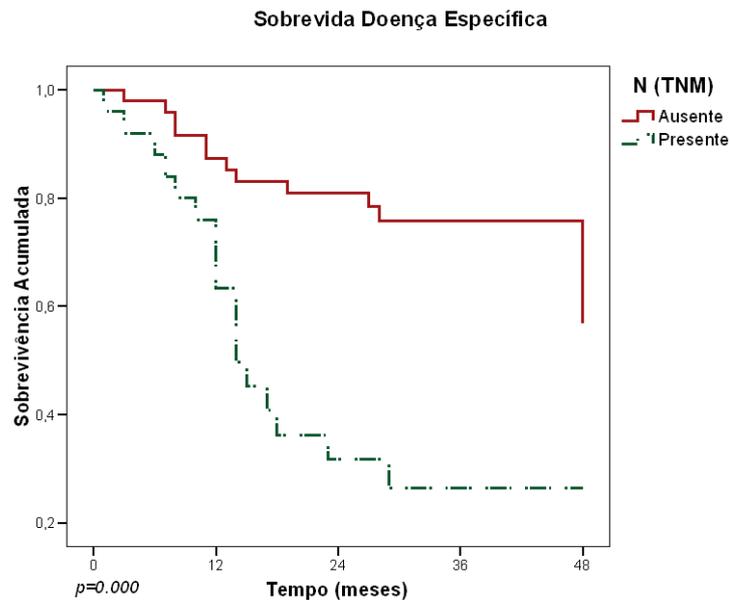
**Figura 4.** Curva de sobrevida livre de doença de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral a positividade de expressão de PHD3 citoplasmática.

Pode-se observar que nos primeiros 24 meses após o seguimento cirúrgico 10% dos pacientes com expressão fraca de PHD3 nuclear morreram enquanto no mesmo período 40% dos pacientes com expressão forte de PHD3 nuclear foram a óbito. A análise multivariada apontou que a intensidade de marcação da proteína PHD3 nuclear é fator de proteção para uma melhor sobrevida doença específica, conferindo um risco diminuído (HR = 0.337, IC = 0.09-1.17, Tabela 8, Figura 5).



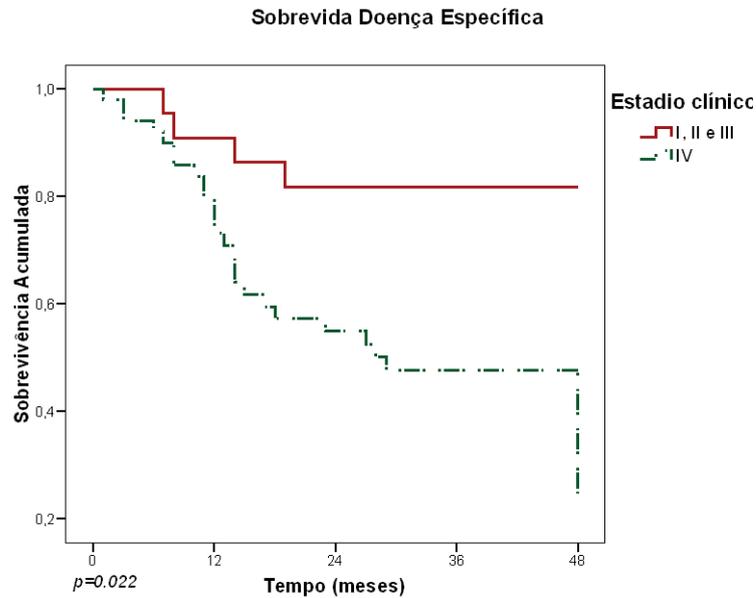
**Figura 5** – Curva de sobrevida doença específica de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral segundo a intensidade da expressão de PHD3 nuclear.

A sobrevida doença específica esteve associada significativamente ao *status* linfonodal (Wilcoxon  $p = 0.000$ ). Nos primeiros 24 meses após a cirurgia 20% dos pacientes sem comprometimento linfonodal foram a óbito pelo câncer enquanto que 65% dos pacientes com acometimento linfonodal morreram. A análise multivariada mostrou que o acometimento linfonodal confere ao paciente uma pior sobrevida doença específica em aproximadamente 8 vezes (HR = 7.492, IC = 2.37-23.67, Tabela 8, Figura 6).



**Figura 6.** Curva de sobrevida doença específica de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral segundo o N (TNM).

O estágio clínico esteve associado significativamente à sobrevida doença específica (Wilcoxon  $p = 0.022$ ). Observa-se que após 24 meses do tratamento cirúrgico 20% dos pacientes em estágio clínico de I a III foram a óbito e 55% dos com estágio IV morreram no mesmo período. Em análise multivariada foi possível verificar que o estadiamento avançado confere uma pior sobrevida doença específica aumentada em cerca de 14 vezes (HR = 13.545, IC = 1.54-119.13, Tabela 8, Figura 7).



**Figura 7.** Curva de sobrevida doença específica de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral segundo o estágio clínico.

#### *Elementos versus expressão de HIF1- $\alpha$ e PHD3*

Em análise bivariada a positividade da expressão nuclear de HIF1- $\alpha$  foi associada significativamente aos elementos arsênio e bromo ( $p = 0.037$ , ambos, Tabela 9). A análise revelou ainda, que a intensidade de marcação nuclear de HIF1- $\alpha$  foi associada ao elemento cloro ( $p = 0.026$ , Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  nuclear com a caracterização elementar.

(continua)

Elemento	Positividade			Intensidade		
	Negativo	Positivo	p	Fraca	Forte	p
	No. (%)	No. (%)		No. (%)	No. (%)	
<b>Magnésio</b>						
Ausência	7 100	60 88,2	0,438	24 92,3	36 85,7	0,341
Presença	0 0,0	8 11,8		2 7,7	6 14,3	
<b>Fósforo</b>						
Ausência	1 14,3	4 5,9	0,396	2 7,7	2 4,8	0,496
Presença	6 85,7	64 94,1		24 92,3	40 95,2	
<b>Enxofre</b>						
Ausência	0 0,0	1 1,5	0,907	1 3,8	0 0,0	0,382
Presença	7 100	67 98,5		25 96,2	42 100	

**Tabela 9.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  nuclear com a caracterização elementar.

Elemento	(conclusão)									
	Positividade			Intensidade						
	Negativo	Positivo	p	Fraca	Forte	p				
No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	p		
<b>Cloro</b>										
Ausência	4	57,1	44	64,7	0,493	21	80,8	23	54,8	<b>0,026</b>
Presença	3	42,9	24	35,3		5	19,2	19	45,2	
<b>Potássio</b>										
Ausência	1	14,3	12	17,6	0,650	5	19,2	7	16,7	0,516
Presença	6	85,7	56	82,4		21	80,8	35	83,3	
<b>Cálcio</b>										
Ausência	0	0,0	1	1,5	0,907	1	3,8	0	0,0	0,382
Presença	7	100	67	98,5		25	96,2	42	100	
<b>Cromo</b>										
Ausência	5	71,4	38	55,9	0,355	16	61,5	22	52,4	0,460
Presença	2	28,6	30	44,1		10	38,5	20	47,6	
<b>Manganês</b>										
Ausência	5	71,4	45	66,2	0,571	16	61,5	29	69,0	0,525
Presença	2	28,6	23	33,8		10	38,5	13	31,0	
<b>Ferro</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	7	100	68	100		26	100	42	100	
<b>Cobalto</b>										
Ausência	7	100	59	86,8	0,392	22	84,6	37	88,1	0,681
Presença	0	0,0	9	13,2		4	15,4	5	11,9	
<b>Níquel</b>										
Ausência	7	100	58	85,3	0,351	24	92,3	34	81	0,177
Presença	0	0,0	10	14,7		2	7,7	8	19	
<b>Cobre</b>										
Ausência	1	14,3	3	4,4	0,330	1	3,8	2	4,8	0,676
Presença	6	85,7	65	95,6		25	96,2	40	95,2	
<b>Zinco</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	7	100	68	100		26	100	42	100	
<b>Arsênio</b>										
Ausência	5	71,4	20	29,4	<b>0,037</b>	11	42,3	9	21,4	0,066
Presença	2	28,6	48	70,6		15	57,7	33	78,6	
<b>Bromo</b>										
Ausência	5	71,4	20	29,4	<b>0,037</b>	11	42,3	9	21,4	0,066
Presença	2	28,6	48	70,6		15	57,7	33	78,6	

A análise bivariada revelou que a intensidade de marcação citoplasmática de HIF1- $\alpha$  está associada com os elementos cloro ( $p = 0.002$ ) e com os elementos arsênio e bromo ( $p = 0.036$ , ambos). Não foram observadas associações significativas da positividade citoplasmática de HIF1- $\alpha$  com os elementos estudados (Tabela 10).

**Tabela 10.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  citoplasmática com a caracterização elementar.

(continua)

Elemento	Positividade					Intensidade				
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Magnésio</b>										
Ausência	4	100	63	88,7	0,631	24	92,3	39	86,7	0,380
Presença	0	0,0	8	11,3		2	7,7	6	13,3	
<b>Fósforo</b>										
Ausência	0	0,0	5	7,0	0,754	3	11,5	2	4,4	0,254
Presença	4	100	66	93,0		23	88,5	43	95,6	
<b>Enxofre</b>										
Ausência	0	0,0	1	1,4	0,947	1	3,8	0	0,0	0,366
Presença	4	100	70	98,6		25	96,2	45	100	
<b>Cloro</b>										
Ausência	1	25,0	47	66,2	0,130	23	88,5	24	53,3	<b>0,002</b>
Presença	3	75,0	24	33,8		3	11,5	21	46,7	
<b>Potássio</b>										
Ausência	0	0,0	13	18,3	0,459	6	23,1	7	15,6	0,430
Presença	4	100	58	81,7		20	76,9	38	84,4	
<b>Cálcio</b>										
Ausência	0	0,0	1	1,4	0,947	1	3,8	0	0,0	0,366
Presença	4	100	70	98,6		25	96,2	45	100	
<b>Cromo</b>										
Ausência	3	75,0	40	56,3	0,426	17	65,4	23	51,1	0,243
Presença	1	25,0	31	43,7		9	34,6	22	48,9	
<b>Manganês</b>										
Ausência	3	75,0	47	66,2	0,593	16	61,5	31	68,9	0,528
Presença	1	25,0	24	33,8		10	38,5	14	31,1	
<b>Ferro</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	4	100	71	100		26	100	45	100	

**Tabela 10.** Análise bivariada da expressão HIF1- $\alpha$  citoplasmática com a caracterização elementar.

(conclusão)

Elemento	Positividade			Intensidade							
	Negativo		Positivo		p		Frac		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)			No.	(%)	No.	(%)	
<b>Cobalto</b>											
Ausência	4	100	62	87,3	0,593		22	84,6	40	88,9	0,430
Presença	0	0,0	9	12,7			4	15,4	5	11,1	
<b>Níquel</b>											
Ausência	4	100	61	85,9	0,557		24	92,3	37	82,2	0,209
Presença	0	0,0	10	14,1			2	7,7	8	17,8	
<b>Cobre</b>											
Ausência	0	0,0	4	5,6	0,799		2	7,7	2	4,4	0,620
Presença	4	100	67	94,4			24	92,3	43	95,6	
<b>Zinco</b>											
Ausência	0	0,0	0	0,0	-		0	0,0	0	0,0	-
Presença	4	100	71	100			26	100	45	100	
<b>Arsênio</b>											
Ausência	3	75,0	22	31,0	0,105		12	46,2	10	22,2	<b>0,036</b>
Presença	1	25,0	49	69,0			14	53,8	35	77,8	
<b>Bromo</b>											
Ausência	3	75,0	22	31,0	0,105		12	46,2	10	22,2	<b>0,036</b>
Presença	1	25,0	49	69,0			14	53,8	35	77,8	

Para a proteína PHD3, a intensidade de marcação nuclear foi associada com os elementos fósforo ( $p = 0.037$ ) e níquel ( $p = 0.041$ ). Não foram observadas associações significativas da positividade nuclear de PHD3 com os elementos estudados (Tabela 11).

**Tabela 11.** Análise bivariada da expressão PHD3 nuclear com a caracterização elementar.

(continua)

Elemento	Positividade					Intensidade				
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Magnésio</b>										
Ausência	21	87,5	45	91,8	0,418	30	93,8	15	88,2	0,432
Presença	3	12,5	4	8,2		2	6,3	2	11,8	
<b>Fósforo</b>										
Ausência	1	4,2	3	6,1	0,601	0	0	3	17,6	<b>0,037</b>
Presença	23	95,6	46	93,9		32	100	14	82,4	
<b>Enxofre</b>										
Ausência	1	4,2	0	0	0,329	0	0,0	0	0,0	-
Presença	23	95,8	49	100		32	100	17	100	
<b>Cloro</b>										
Ausência	16	66,7	32	65,3	0,908	22	68,8	10	58,8	0,487
Presença	8	33,3	17	34,7		10	31,3	7	41,2	
<b>Potássio</b>										
Ausência	5	20,8	8	16,3	0,432	4	12,5	4	23,5	0,273
Presença	19	79,2	41	83,7		28	87,5	13	76,5	
<b>Cálcio</b>										
Ausência	1	4,2	0	0	0,329	0	0,0	0	0,0	-
Presença	23	95,8	49	100		32	100	17	100	
<b>Cromo</b>										
Ausência	12	50	30	61,2	0,362	20	62,5	10	58,8	0,801
Presença	12	50	19	38,8		12	37,5	7	41,2	
<b>Manganês</b>										
Ausência	15	62,5	33	67,3	0,682	20	62,5	13	76,5	0,253
Presença	9	37,5	16	32,7		12	37,5	4	23,5	
<b>Ferro</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	24	100	49	100		32	100	17	100	
<b>Cobalto</b>										
Ausência	22	91,7	43	87,8	0,474	30	93,8	13	76,5	0,099
Presença	2	8,3	6	12,2		2	6,3	4	23,5	
<b>Níquel</b>										
Ausência	21	87,5	42	85,7	0,573	30	93,8	12	70,6	<b>0,041</b>
Presença	3	12,5	7	14,3		2	6,3	5	29,4	
<b>Cobre</b>										
Ausência	2	8,3	1	2	0,250	0	0	1	5,9	0,347
Presença	22	91,4	48	98		0	100	5,9	94,1	

**Tabela 11.** Análise bivariada da expressão PHD3 nuclear com a caracterização elementar.

(conclusão)

Elemento	Positividade					Intensidade				
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Zinco</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	24	100	49	100		32	100	17	100	
<b>Arsênio</b>										
Ausência	7	29,2	17	34,7	0,637	11	34,4	6	35,3	0,949
Presença	17	70,8	32	65,3		21	65,6	11	64,7	
<b>Bromo</b>										
Ausência	7	29,2	17	34,7	0,637	11	34,4	6	35,3	0,949
Presença	17	70,8	32	65,3		21	65,6	11	64,7	

Em relação a expressão citoplasmática da proteína PHD3, a positividade foi associada com o elemento cobre ( $p = 0.037$ ). Os elementos estudados não foram associados com a intensidade de expressão citoplasmática de PHD3 (Tabela 12).

**Tabela 12.** Análise bivariada da expressão PHD3 citoplasmática com a caracterização elementar.

(continua)

Elemento	Positividade					Intensidade				
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Magnésio</b>										
Ausência	23	92,0	43	89,6	0,549	31	91,2	12	85,7	0,458
Presença	2	8,0	5	10,4		3	8,8	2	14,3	
<b>Fósforo</b>										
Ausência	1	4,0	3	6,3	0,576	1	2,9	2	14,3	0,200
Presença	24	96,0	45	93,8		33	97,1	12	85,7	
<b>Enxofre</b>										
Ausência	1	4,0	0	0	0,342	0	0,0	0	0,0	-
Presença	24	96,0	48	100,0		34	100,0	14	100,0	
<b>Cloro</b>										
Ausência	19	76,0	29	60,4	0,183	22	64,7	7	50,0	0,344
Presença	6	24,0	19	39,6		12	35,3	7	50,0	

**Tabela 12.** Análise bivariada da expressão PHD3 citoplasmática com a caracterização elementar.

(conclusão)

Elemento	Positividade					Intensidade				
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
<b>Potássio</b>										
Ausência	4	16,0	9	18,8	0,521	6	17,6	3	21,4	0,525
Presença	21	84,0	39	81,3		28	82,4	11	78,6	
<b>Cálcio</b>										
Ausência	1	4,0	0	0	0,342	0	0,0	0	0,0	-
Presença	24	96,0	48	100,0		34	100,0	14	100,0	
<b>Cromo</b>										
Ausência	15	60,0	27	56,3	0,758	22	64,7	5	35,7	0,064
Presença	10	40,0	21	43,8		12	35,3	9	64,3	
<b>Manganês</b>										
Ausência	17	68,0	31	64,6	0,770	22	64,7	9	64,3	0,614
Presença	8	32,0	17	35,4		12	35,3	5	35,7	
<b>Ferro</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	25	100,0	48,0	100,0		34	100,0	14	100,0	
<b>Cobalto</b>										
Ausência	23	92,0	42	87,5	0,439	31	91,2	11	78,6	0,229
Presença	2	8,0	6	12,5		3	8,8	3	21,4	
<b>Níquel</b>										
Ausência	22	88,0	41	85,4	0,533	30	88,2	11	78,6	0,327
Presença	3	12,0	7	14,6		4	11,8	3	21,4	
<b>Cobre</b>										
Ausência	3	12,0	0	0	<b>0,037</b>	0	0,0	0	0,0	-
Presença	22	88,0	48	100,0		34	100,0	14	100,0	
<b>Zinco</b>										
Ausência	0	0,0	0	0,0	-	0	0,0	0	0,0	-
Presença	25	100,0	48	100,0		34	100,0	14	100,0	
<b>Arsênio</b>										
Ausência	9	36,0	15	31,3	0,682	9	26,5	6	42,9	0,266
Presença	16	64,0	33	68,8		25	73,5	8	57,1	
<b>Bromo</b>										
Ausência	9	36,0	15	31,3	0,682	9	26,5	6	42,9	0,266
Presença	16	64,0	33	68,8		25	73,5	8	57,1	

Em análise de regressão logística multivariada, não foram verificadas nenhuma associação da positividade e da intensidade de expressão nuclear de HIF1- $\alpha$  com os parâmetros estudados (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise multivariada entre expressão de HIF1- $\alpha$ , status linfonodal, tamanho tumoral, estágio clínico e os elementos cloro, níquel e arsênio.

Variáveis	Análise multivariada			
	HIF1- $\alpha$ nuclear		HIF1- $\alpha$ citoplasmática	
	Positividade		Intensidade	
	OR (CI 95%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)	<i>p</i>
<b>N (TNM)*</b>				
Negativo			1	
Positivo			2.815 (0.87-9.09)	0.084
<b>T (TNM)*</b>				
pT1/pT2			1	
pT3/pT4			2.999 (0.98-9.13)	0.053
<b>Estádio clínico</b>				
I, II e III		1		
IV	3.387 (0.60-23.81)	0.156		
<b>Cloro</b>				
Ausente			1	
Presente			2.700 (0.79-9.19)	0.112
<b>Níquel</b>				
Ausente			1	
Presente			3.184 (0.54-18.66)	0.199
<b>Arsênio</b>				
Ausente		1		
Presente	3.387 (0.60-23.81)	0.156		

\*Classificação TNM (7ª edição).

Ao passo que a intensidade de expressão citoplasmática de HIF1- $\alpha$ , em análise multivariada, foi associada com o tamanho tumoral ( $p = 0.017$ ) e com o elemento cloro ( $p = 0.011$ ). Os tumores com tamanhos pT3 e pT4 tem uma chance aumentada em aproximadamente 4 vezes de apresentar expressão citoplasmática forte (OR = 4.143, IC = 1.28-13.32, Tabela 14).

Em relação a positividade de expressão de PHD3 citoplasmática, a análise logística multivariada revelou que o estágio clínico III ( $p = 0.011$ ) e o estágio clínico IV ( $p = 0.003$ ) aumentam as chances do pacientes apresentarem positividade para a PHD3 citoplasmática (OR = 16.892, IC = 1.89-150.86 e OR = 18.875, IC = 2.76-128.75, respectivamente, Tabela 15). A mesma análise apontou que o consumo atual de álcool diminui as chances dos pacientes que consomem álcool apresentarem positividade citoplasmática de PHD3 (OR = 0.129, IC = 0.03-0.45, Tabela 15).

Para a intensidade de marcação citoplasmática de PHD3, a análise multivariada mostrou que o a presença do elemento cromo aumenta as chances de o paciente apresentarem expressão forte de PHD3 citoplasmática (OR = 5.913, IC = 1.30-26.81,  $p = 0.021$ , Tabela 15).

**Tabela 14.** Análise multivariada entre expressão de HIF1- $\alpha$ , status linfonodal, tamanho tumoral e o elemento cloro.

Variáveis	Análise multivariada	
	HIF1- $\alpha$ citoplasmática	
	Intensidade	
	OR (IC 95%)	$p$
<b>N (TNM)*</b>		
Negativo	1	
Positivo	2.463 (0.74-8.19)	0.142
<b>T (TNM)*</b>		
T1/T2	1	
T3/T4	4.143 (1.28-13.32)	<b>0.017</b>
<b>Cloro</b>		
Ausente	1	
Presente	6.081 (1.50-24.61)	<b>0.011</b>

\*Classificação TNM (7ª edição).

**Tabela 15.** Análise multivariada entre expressão de PHD3, status linfonodal, estágio clínico, consumo atual de álcool e o elemento cromo.

Variáveis	Análise multivariada			
	PHD3 citoplasmática		PHD3 citoplasmática	
	Positividade		Intensidade	
	OR (CI 95%)	$p$	OR (CI 95%)	$p$
<b>N (TNM)*</b>				
Negativo			1	
Positivo			0.173 (0.02-1.09)	0.062
<b>Estádio clínico</b>				
II	1			
III	16.892 (1.89-150.86)	<b>0.011</b>		
IV	18.875 (2.76-128.75)	<b>0.003</b>		
<b>Consumo atual de álcool</b>				
Não	1		1	
Sim	0.129 (0.03-0.45)	<b>0.002</b>	0.280 (0.04-1.71)	0.168
<b>Cromo</b>				
Ausente			1	
Presente			5.913 (1.30-26.81)	<b>0.021</b>

\*Classificação TNM (7ª edição).

## DISCUSSÃO

Os resultados mostraram uma relação da intensidade expressão de HIF-1 $\alpha$ , tanto nuclear quanto citoplasmática, com o tamanho do tumor, no qual os tumores

maiores expressaram fortemente a proteína. Tal fato é devido a condição natural de hipóxia que é provocada pelo aumento do tamanho tumoral e esse promove o incremento da expressão de HIF-1 $\alpha$  (SEMENZA, 1999). Além disto, neste estudo, tumores maiores elevam as chances de incremento da intensidade de expressão citoplasmática de HIF-1 $\alpha$ .

No presente estudo não foram observadas a associação da expressão de HIF-1 $\alpha$  com os fatores prognósticos. Contudo, Mendes et al., (2014), verificaram que fraca expressão de HIF-1 $\alpha$  infiltrado inflamatórios das margens tumorais e no tumor aumentaram a recidiva e o risco de morte em 30%, em comparação com a forte expressão nas margens do tumor, definindo um alto risco independente de qualquer outro fator.

Santos et al., (2012), relataram que a expressão fraca de HIF-1 $\alpha$  é um marcador independente para recidiva local, representando um risco aumentado superior a 7 vezes em relação à expressão forte, o que leva a esses autores a sugerir a utilização da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  como marcador para avaliar melhor as opções terapêuticas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Neste estudo, foi observado uma associação da intensidade de expressão nuclear e citoplasmática de HIF-1 $\alpha$  com a presença do elemento cloro, assim como da positividade de expressão nuclear e citoplasmática com os elementos arsênio e bromo. Sabe-se que alguns elementos químicos podem interferir com a atividade de proteínas e assim modificar a expressão das mesmas. Por exemplo, o ferro pode ser substituído por outros elementos de maior afinidade com o núcleo catalítico, fazendo a perda de função enzimática (SEMENZA, 2003; POLLARD et al., 2008).

Além disto, neste estudo, a presença de cloro eleva as chances de aumento na intensidade da expressão HIF-1 $\alpha$ . Sabe-se que os íons cloreto desempenham um papel relevante na homeostase celular e a variação do seu fluxo está associado a regulação do volume, processos secretórios e manutenção do pH celular (FOSKETT, 1998; AUZANNEAU et al, 2006).

Em nosso estudo, verificou-se também que a presença dos elementos fósforo e níquel com a intensidade de expressão nuclear de PHD3, do cobre com a positividade de expressão citoplasmática e que a presença do cromo eleva as chances de aumento da intensidade de expressão citoplasmática de PHD3.

Acredita-se que esses elementos podem ter substituído o núcleo metálico da PHD3 e essa mudança tenha desencadeado alterações no funcionamento da mesma. O níquel, por exemplo, em quantidades elevadas apresenta maior afinidade pelo núcleo metálico da PHD, o que resulta na alteração da função desta proteína (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008).

Em relação a expressão de PHD3 com as características clinicopatológicas e prognósticas, no presente estudo foi observado a associação da positividade de expressão citoplasmática de PHD3 com o estadió clínico avançado, nos quais pacientes em estadió avançado apresentam maiores chances de expressão da proteína. Em carcinoma hepatocelular, Ma et al. (2017) verificaram que a expressão forte foi mais presente no indivíduos em estadió I e II.

Högel et al (2013) demonstraram que o aumento da expressão de PHD3 sob hipóxia aumenta a progressão do ciclo celular e a sobrevivência do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Por outro lado, Liu et al., (2013) destacaram que a PHD3 desempenha papéis significativos na supressão do crescimento, angiogênese, diferenciação e metástase e promoção da apoptose de tumores em condições hipóxicas.

Além do mais, no presente estudo, a positividade de expressão de PHD3 citoplasmática esteve associada com a recidiva e o óbito, aumentando as chances de os pacientes recidivarem e irem a óbito pelo câncer. Estudos recentes sugerem a PHD como um potencial supressor de tumor devido à sua função de regulação da via da HIF (XUE et al., 2010).

## **CONCLUSÃO**

Com o presente trabalho foi possível concluir que existe uma associação do tamanho tumoral e da presença de cloro com intensidade expressão citoplasmática de HIF-1 $\alpha$ , bem como a associação estadió clínico avançado e do consumo atual de álcool na positividade de expressão citoplasmática de PHD3 e da presença de cromo com a intensidade de expressão citoplasmática da mesma proteína.

Conclui-se também que o status linfonodal e o estadió clínico são importantes no prognóstico e sobrevida dos pacientes. Esse estudo apresenta dados inéditos sobre

o perfil elementar, os hábitos e a expressão de HIF-1 $\alpha$  e PHD3 com os fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

## REFERÊNCIAS

AUZANNEAU C, NOREZ C, NOËL S, JOUGLA C, BECQ F, VANDEBROUCK C. Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells. **Reprod Nutr Dev.** 2006;46(3):241-55.

CHEN F, DING M, CASTRANOVA V, SHI X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. **Molecular and Cellular Biochemistry** 2001 Jun;222(1-2):159-71.

CHEN, F.; DING, M.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, n. 1-2, p. 159–171, 2001.

CRUZ, M. T.; GONCALO, M.; FIGUEIREDO, A.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B.; LOPES, M. C. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF-kB and AP-1 and increases the expression. of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 1, p. 18–26, 2004.

FINNEY, L.; VOGT, S.; FUKAI, T.; GLESNE, D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 1, p. 88-94, 2009.

FOSKETT JK. CIC and CFTR chloride channel gating. **Annu Rev Physiol.** 1998; 60:689-717.

GILLISON, M.L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head Neck**, v. 29, n. 8, p. 779-92, 2007.

GOLEBIEWSKI, F.; KASPRZAK, K. S. Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel (II). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 279, p. 133–139, 2005.

HAN, S.; CHEN, Y.; GE, X.; ZHANG, M.; WANG, J.; ZHAO, Q.; HE, J.; WANG, Z. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, v. 10, n. 1, p. 196, 2010.

HARRIS, B.H.; BARBERIS, A.; WEST, C.M.; BUFFA, F.M. Gene expression signatures as biomarkers of tumour hypoxia. **Clinical Oncology**, v. 27, n. 10, p. 547-560, 2015.

HÖGEL, H.; RANTANEN, K.; JOKILEHTO, T.; GRENNAN, R.; JAAKKOLA, P.M. Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

KAELIN, W. G.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular Cell**, v. 30, p. 393-402, 2008.

LEEMANS, C.R.; BRAAKHUIS, B.J.; BRAKENHOFF, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature reviews cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LIU, Q.L.; LIANG, Q.L.; LI, Z.Y.; ZHOU, Y.; OU, W.T.; HUANG, Z.G. Function and expression of prolyl hydroxylase 3 in cancers. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 4, p. 589-593, 2013.

MAJEWSKA, U.; BRAZIEWICZ, J.; BANAS, D.; KUBALA-KUKUS, A.; GÓZDŹ, S.; PAJEK, M.; SMOK, J.; URBANIAK, A. An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. **Biological trace element research**, v. 60, n. 1-2, p. 91-100, 1997.

MENDES, S.O.; SANTOS, M.; PETERLE, G.T.; MAIA, L.L.; STUR, E.; AGOSTINI, L.P.; CARVALHO, M.B.; TAJARA, E.H.; LOURO, I.D.; TRIVILIN, L.O.; SILVA-CONFORTI, A.M.A. HIF-1 $\alpha$  Expression Profile in Intratumoral and Peritumoral Inflammatory Cells as a Prognostic Marker for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

PFISTER, D.G.; ANG, K.; BRIZEL, D.M.; BURTNES, B. A.; CMELAK, A.J.; COLEVAS, A.D.; DUNPHY, F.; EISELE, D.W.; GILBERT, J.; GILLISON, M.L.; HADDAD, R.I.; HAUGHEY, B.H.; HICKS, W.L.; HITCHCOCK, Y. J.; KIES, M.S.; LYDIATT, W.M.; MAGHAMI, E.; MARTINS, R.; MCCAFFREY, T.; MITTAL, B.B.;

PINTO, H.A.; RIDGE, J.A.; SAMANT, S.; SANGUINETI, G.; SCHULLER, D.E.; SHAH, J.P.; SPENCER, S.; TROTTI, A.; WEBER, R.S.; WOLF, G.T.; WORDEN, F. Head and Neck Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 9, n. 6, p. 596-650, 2011.

POLLARD, P.J.; LOENARZ, C.; MOLE, D.R.; MCDONOUGH, M.A.; GLEADLE, J.M.; SCHOFIELD, C.J.; RATCLIFFE, P.J. Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . **Biochemical Journal**, v. 416, n. 3, p. 387-394, 2008.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 28-44, 2007.

SANTOS, M.; MERCANTE, A.M.C.; LOURO, I.D.; GONÇALVES, A.J.; CARVALHO, M.B. SILVA, E.H.T.; SILVA, A.M.A. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annu Rev Cell Dev Bio**, n.15, p. 551–78, 1999.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature reviews cancer**, v.3, n.10, p. 721-732, 2003.

SUH KS, YUSPA SH. Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design** 2005;11(21):2753-64.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva: World Health Organization, 1996. 343 p.

XUE, J.; LI, X.; JIAO, S.; WEI, Y.; WU, G.; FANG, J. Prolyl Hydroxylase-3 is downregulated in Colorectal Cancer Cells and Inhibits IKKB Independent of Hydroxylase Activity. **Gastroenterology**, v.138, 2010; p. 606-615.

## CONCLUSÃO GERAL

Com o presente trabalho foi possível caracterizar as amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral quanto à presença dos elementos magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, cromo, manganês, ferro, zinco, cobalto, níquel, cobre, arsênio e bromo. O hábito tabagista influenciou a presença dos elementos magnésio, cromo, manganês, arsênio e bromo. Os elementos magnésio e níquel estiveram associados ao histórico de consumo de tabaco, ao passo que os elementos cloro, arsênio e bromo ao consumo atual de tabaco.

Além disto, os elementos cloro e cromo estiveram associados com o prognóstico, no qual o elemento cloro foi apontado como fator independente de proteção para a recidiva e para uma melhor sobrevida livre de doença. O elemento cromo, o estadió clínico avançado e o consumo de álcool influenciaram a intensidade expressão da proteína PHD3 e o elemento cloro e o tamanho tumoral a expressão da proteína HIF-1 $\alpha$ .

Esse estudo apresenta dados inéditos sobre o perfil elementar, os hábitos e a expressão de HIF-1 $\alpha$  e PHD3 com os fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDROV, L.B.; JU, Y.S.; HAASE, K.; VAN LOO, P.; MARTINCORENA, I.; NIK-ZAINAL, S.; TOTOKI, Y.; FUJIMOTO, A.; NAKAGAWA, H.; SHIBATA, T.; CAMPBELL, P.J.; VINEIS, P.; PHILLIPS, D.H.; STRATTON, M.R. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. **Science**,v. 354, n. 6312, p. 618-622, 2016.

ALEXANDROV, L.B.; STRATTON, M.R. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes.**Current Opinion in Genetics & Development**,v. 24, p. 52-60, 2014.

AMIN, M.B.; GREENE, F.L.; EDGE, S.B.; COMPTON, C.C.; GERSHENWALD, J.E.; BROOKLAND, R.K.; MEYER, L.; GRESS, D.M.; BYRD, D.R.; WINCHESTER, D.P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017.

ANG, K.K.; HARRIS, J.; WHEELER, R.; WEBER, R.; ROSENTHAL, D.I.; NGUYENTAN, P.F.; WESTRA, W.H.; CHUNG, C.H.; JORDAN, R.C.; LU, C.; KIM, H.; AXELROD, R.; SILVERMAN, C.C.; REDMOND, K.P.; GILLISON, M.L. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **The new england journal of medicine**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.

AXELSSON, L.; NYMAN, J.; HAUGEN-CANGE, H.; BOVE, M.; JOHANSSON, L.; DE LARA, S.; KOVÁCS, A.; HAMMERLID, E. Prognostic factors for head and neck cancer of unknown primary including the impact of human papilloma virus infection.**Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 46, n. 1, 2017.

BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; ALTIERI, A.; COGLIANO, V.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of alcoholic beverages.**The Lancet Oncology**, v. 8, n. 4, p. 292-293, 2007.

BEYER, S.; KRISTENSEN, M. M.; JENSEN, K. S.; JOHANSEN, J. V.; STALLER, P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 36542-36552, 2008.

BISHOP, T.; RATCLIFFE, P.J. Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives. **Hypoxia**, v. 2, p. 197-213, 2014.

BOURHIS, J.; OVERGAARD, J.; AUDRY, H.; ANG, K.K.; SAUNDERS, M.; BERNIER, J.; HORIOT, J.C.; LE MAÎTRE, A.; PAJAK, T.F.; POULSEN, M.G.; O'SULLIVAN, B.; DOBROWSKY, W.; HLINIAC, A.; SKLADOWSKI, K.; HAY, J.H.; PINTO, L.H.; FALLAI, C.; FU, K.K.; SYLVESTER, R.; PIGNON, J.P.; META-ANALYSIS OF RADIOTHERAPY IN CARCINOMAS OF HEAD AND NECK (MARCH) COLLABORATIVE GROUP. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. **Lancet**, v. 368, n. 9538, p. 843–854, 2006.

CAJAIBA, M.M.; NEVES, J.I.; CASAROTTI, F.F.; DE CAMARGO, B.; CHAPCHAP, P.; SREDNI, S.T.; SOARES, F.A. Hepatoblastomas and liver development: a study of cytokeratin immunoexpression in twenty-nine hepatoblastomas. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 9, n. 3, p. 196-202, 2006.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488-2492, 1996.

CHATURVEDI, A.K.; ENGELS, E.A.; PFEIFFER, R.M.; HERNANDEZ, B.Y.; XIAO, W.; KIM, E.; JIANG, B.; GOODMAN, M.T.; SIBUG-SABER, M.; COZEN, W.; LIU, L.; LYNCH, C.F.; WENTZENSEN, N.; JORDAN, R.C.; ALTEKRUSE, S.; ANDERSON, W. F.; ROSENBERG, P.S.; GILLISON, M.L. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294-4301, 2011.

CHEN, F.; DING, M.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Carcinogenic metals and NF-kappaB activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, n. 1-2, p. 159–171, 2001.

CHENG, S.J.; LEE, J.J.; KOK, S.H.; CHOU, C.H.; CHANG, H.H.; YANG, H.; CHIANG, M.L.; KUO, M.Y. Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 50-57, 2011.

CHRISTOPOULOS, A.; AHN, S.M.; KLEIN, J.D.; KIM, S. BIOLOGY OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS IN HEAD AND NECK CANCER: BEYOND ANGIOGENESIS. **Head & neck**, v. 33, n. 8, p. 1220-1229, 2011.

CRUZ, M. T.; GONCALO, M.; FIGUEIREDO, A.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B.; LOPES, M. C. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF-kB and AP-1 and increases the expression. of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 1, p. 18–26, 2004.

DE LIMA, P.O.; JORGE, C.C.; OLIVEIRA, D.T.; PEREIRA, M.C. Hypoxic condition and prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 34, n. 2, p. 605-612, 2014.

DEMPLE, B.; SUNG, J.S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. **DNA Repair**, v. 4, n. 12, p. 1442-1449, 2005.

DÖBRÓSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 1, p. 9-17, 2005.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

FINNEY, L.; VOGT, S.; FUKAI, T.; GLESNE, D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 1, p. 88-94, 2009.

FRANCHI, A.; SANTUCCI, M.; MASINI, E.; SARDI, I.; PAGLIERANI, M.; GALLO, O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer**, v. 95, n. 9, p. 1902-1910, 2002.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. **Physics in medicine and biology**, v. 49, n. 1, p. 99, 2003.

GILLISON, M.L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head Neck**, v. 29, n. 8, p. 779-92, 2007.

GILLISON, M.L.; CHATURVEDI, A.K.; ANDERSON, W.F.; FAKHRY, C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 29, p. 3235–3242, 2015.

GILLISON, M.L.; KOCH, W.M.; CAPONE, R.B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W.H.; WU, L.; ZAHURAK, M.L.; DANIEL, R.W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D.E.; SHAH, K.V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 709-720, 2000.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524–548, 2017.

GOLEBIEWSKI, F.; KASPRZAK, K. S. Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel (II). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 279, p. 133–139, 2005.

HAN, S.; CHEN, Y.; GE, X.; ZHANG, M.; WANG, J.; ZHAO, Q.; HE, J.; WANG, Z. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, v. 10, n. 1, p. 196, 2010.

HARRIS, B.H.; BARBERIS, A.; WEST, C.M.; BUFFA, F.M. Gene expression signatures as biomarkers of tumour hypoxia. **Clinical Oncology**, v. 27, n. 10, p. 547-560, 2015.

HECHT, S.S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 733-744, 2003.

HEWITSON, K. S.; MCNEILL, L. A.; RIORDAN, M. V.; TIAN, Y.; BULLOCK, A. N.; WELFORD, R. W.; ELKINS, J. M.; OLDHAM, N. J.; BHATTACHARYA, S.; GLEADLE, J. M.; RATCLIFFE, P. J.; PUGH, C. W.; SCHOFIELD, C. J. Hypoxia-inducible Factor (HIF) Asparagine Hydroxylase Is Identical to Factor Inhibiting HIF (FIH) and Is Related to the Cupin Structural Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26351–26355, 2002.

HÖGEL, H.; RANTANEN, K.; JOKILEHTO, T.; GRENMAN, R.; JAAKKOLA, P.M. Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

HUANG, L. E.; ARANY, Z.; LIVINGSTON, D. M.; BUNN, H. F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 32253–32259, 1996.

HUNG, P.S.; TU, H.F.; KAO, S.Y.; YANG, C.C.; LIU, C.J.; HUANG, T.Y.; CHANG, K.W.; LIN, S.C. miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 5, p. 1162-1171, 2014.

INCA. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

JHAM, B.C.; FREIRE, A.R.S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira De Otorrinolaringologia**, v.72, n.5, p.704-708, 2006.

JOU, A.; HESS, J. Epidemiology and molecular biology of head and neck cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 40, n. 6, p. 328-332, 2017.

KAELIN, W. G.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular Cell**, v. 30, p. 393- 402, 2008.

KIM, S.; PARK, S.; KIM, K. Expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 2015.

KIM, S.; SMITH, B.D.; HAFFTY, B.G. PROGNOSTIC FACTORS IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK CANCER. In: HARRISON, L.B.; SESSIONS, R.B.;KIES, M.S. **Head and Neck Cancer A Multidisciplinary Approach**. 4 edição. Philadelphia: Wolters Kluwer. 2013. p 87-111.

KOLMOGOROV, Y.; KOVALEVA, V.; GONCHAR, A. Analysis of trace elements in scalp hair of healthy people, hyperplasia and breast cancer patients with XRF method. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 448 n. 1-a, p. 457-460, 2000.

KRIEG, A.J.; RANKIN, E.B.; CHAN, D.; RAZORENOVA, O.; FERNANDEZ, S.; GIACCIA, A.J.Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth. **Molecular and Cellular Biology**,v. 30, n. 1, p. 344-353, 2010.

LANDO, D.; PEET, D.J.; GORMAN, J.J.; WHELAN, D.A.; WHITELAW, M.L.; BRUICK, R.K.FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.**Genes & development**, v. 16, n. 12, p. 1466-1471, 2002.

LEEMANS, C.R.; BRAAKHUIS, B.J.; BRAKENHOFF, R.H.The molecular biology of head and neck cancer. **Nature reviews cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LEONCINI, E.; VUKOVIC, V.; CADONI, G.; PASTORINO, R.; ARZANI, D.; BOSETTI, C.; CANOVA, C.; GARAVELLO, W.; LA VECCHIA, C.; MAULE, M.; PETRELLI, L.; PIRA, E.; POLESEL, J.; RICHIARDI, L.; SERRAINO, D.; SIMONATO, L.;

RICCIARDI, W.; BOCCIA, S. Clinical features and prognostic factors in patients with head and neck cancer: Results from a multicentric study. **Cancer epidemiology**, v. 39, n. 3, p. 367-374, 2015.

LIU, Q.L.; LIANG, Q.L.; LI, Z.Y.; ZHOU, Y.; OU, W.T.; HUANG, Z.G. Function and expression of prolyl hydroxylase 3 in cancers. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 4, p. 589-593, 2013.

LIU, X.; GAO, X.L.; LIANG, X.H.; TANG, Y.L. The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 66226–66238, 2016.

MAIA, L. L. **Avaliação da Expressão JMJD1A como Marcador Molecular de Prognóstico em Pacientes com Carcinoma Epidermóide Oral e de Orofaringe**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2014.

MAJEWSKA, U.; BRAZIEWICZ, J.; BANAS, D.; KUBALA-KUKUS, A.; GÓZDZ, S.; PAJEK, M.; SMOK, J.; URBANIAK, A. An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. **Biological trace element research**, v. 60, n. 1-2, p. 91-100, 1997.

MEHANNA, H.; WEST, C.M.; NUTTING, C.; PALERI, V. Head and neck cancer--Part 2: Treatment and prognostic factors. **BMJ**, v. 341, p. 721-725, 2010.

MENDES, S.O.; SANTOS, M.; PETERLE, G.T.; MAIA, L.L.; STUR, E.; AGOSTINI, L.P.; CARVALHO, M.B.; TAJARA, E.H.; LOURO, I.D.; TRIVILIN, L.O.; SILVA-CONFORTI, A.M.A. HIF-1 $\alpha$  Expression Profile in Intratumoral and Peritumoral Inflammatory Cells as a Prognostic Marker for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

MINETA, H.; MIURA, K.; OGINO, T.; TAKEBAYASHI, S.; MISAWA, K.; UEDA, Y.; SUZUKI, I.; DICTOR, M.; BORG, A.; WENNERBERG, J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 6, p. 775-781, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Head and Neck Cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/head-and-neck>. Acesso em: 26 de out. 2017.

PASHA, Q.; MALIK, S.A.; IQBAL, J.; SHAH, M.H. Characterization and distribution of the selected metals in the scalp hair of cancer patients in comparison with normal donors. **Biological Trace Element Research**, v. 118, n. 3, p. 207-216, 2007.

PATEL, S.C.; CARPENTER, W.R.; TYREE, S.; COUCH, M.E.; WEISSLER, M.; HACKMAN, T.; HAYES, D.N.; SHORES, C.; CHERA, B.S. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 1488-1494, 2011.

PETERLE, G.T.; SANTOS, M.; MENDES, S.O.; CARVALHO-NETO, P.B.; MAIA, L.L.; STUR, E.; AGOSTINI, L.P.; SILVA, C.V.; TRIVILIN, L.O.; NUNES, F.D.; CARVALHO, M.B.; TAJARA, E.H.; LOURO, I.D.; SILVA-CONFORTI, A.M. FAS ligand expression in inflammatory infiltrate lymphoid cells as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 11145-11153, 2015.

PFISTER, D.G.; ANG, K.; BRIZEL, D.M.; BURTNES, B. A.; CMELAK, A.J.; COLEVAS, A.D.; DUNPHY, F.; EISELE, D.W.; GILBERT, J.; GILLISON, M.L.; HADDAD, R.I.; HAUGHEY, B.H.; HICKS, W.L.; HITCHCOCK, Y. J.; KIES, M.S.; LYDIATT, W.M.; MAGHAMI, E.; MARTINS, R.; MCCAFFREY, T.; MITTAL, B.B.; PINTO, H.A.; RIDGE, J.A.; SAMANT, S.; SANGUINETI, G.; SCHULLER, D.E.; SHAH, J.P.; SPENCER, S.; TROTTI, A.; WEBER, R.S.; WOLF, G.T.; WORDEN, F. Head and Neck Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 9, n. 6, p. 596-650, 2011.

PICKERING, C.R.; ZHANG, J.; NESKEY, D.M.; ZHAO, M.; JASSER, S.A.; WANG, J.; WARD, A.; TSAI, C.J.; ORTEGA-ALVES, M.V.; ZHOU, J.H.; DRUMMOND, J.; EL-NAGGAR, A.K.; GIBBS, R.; WEINSTEIN, J.N.; WHEELER, D.A.; WANG, J.; FREDERICK, M.J.; MYERS, J.N. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in Young non-smokers is genomically similar to tumors in older smokers. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 14, p. 3842–3848, 2014.

POLLARD, P.J.; LOENARZ, C.; MOLE, D.R.; MCDONOUGH, M.A.; GLEADLE, J.M.; SCHOFIELD, C.J.; RATCLIFFE, P.J. Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . **Biochemical Journal**, v. 416, n. 3, p. 387-394, 2008.

PONNALURI, V.K.; VADLAPATLA, R.K.; VAVILALA, D.T.; PAL, D.; MITRA, A.K.; MUKHERJI, M. Hypoxia induced expression of histone lysine demethylases: implications in oxygen-dependent retinal neovascular diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 2, p. 373–377, 2011.

PRICKAERTS, P.; ADRIAENS, M.E.; BEUCKEN, T.V.D.; KOCH, E.; DUBOIS, L.; DAHLMANS, V.E.H.; GITS, C.; EVELO, C.T.A.; CHAN-SENG-YUE, M.; WOUTERS, B.G.; VONCKEN, J.W. Hypoxia increases genome-wide bivalent epigenetic marking by specific gain of H3K27me3. **Epigenetics & chromatin**, v. 9, n. 1, p. 46, 2016.

RANKIN, E.B.; GIACCIA, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death Differ**, v.15, p.678-685, 2008.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 28-44, 2007.

SANTOS, M. **Avaliação de marcadores moleculares relacionados ao prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe**. 2014. 200 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2014.

SANTOS, M.; MERCANTE, A.M.C.; LOURO, I.D.; GONÇALVES, A.J.; CARVALHO, M.B. SILVA, E.H.T.; SILVA, A.M.A. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

SAPKOTA, A.; HSU, C.C.; ZARIDZE, D.; SHANGINA, O.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; MATES, D.; FABIÁNOVÁ, E.; RUDNAI, P.; JANOUT, V.; HOLCATOVA, I.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Dietary risk factors

for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. **Cancer Causes & Control**, v.19, n.10, p.1161-1170, 2008.

SEMENZA, G. L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annu Rev Cell Dev Bio**, n.15, p. 551–78, 1999.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature reviews cancer**, v.3, n.10, p. 721-732, 2003.

SEMENZA, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.20, n.1, p.51-56, 2010.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. **CA Cancer Journal**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SILVA, M.P.; SOAVE, D.F.; RIBEIRO-SILVA, A.; POLETTI, M.E. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 194, 2012.

SINGH, S.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **Journal of Oncology**, v.2011, 2011.

SZTURZ, P.; BUDÍKOVÁ, M.; VERMORKEN, J.B.; HOROVÁ, I.; GÁL, B.; RAYMOND, E.; DE GRAMONT, A.; FAIVRE, S. Prognostic value of c-MET in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis of aggregate data. **Oral Oncology**, v. 74, p. 68-76, 2017.

THOMPSON, C.M.; WOLF, J.C.; ELBEKAI, R.H.; PARANJPE, M.G.; SEITER, J.M.; CHAPPELL, M.A.; TAPPERO, R.V.; SUH, M.; PROCTOR, D.M.; BICHTELER, A.; HAWS, L.C.; HARRIS, M.A. Duodenal crypt health following exposure to Cr(VI): Micronucleus scoring,  $\gamma$ -H2AX immunostaining, and synchrotron X-ray fluorescence microscopy. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 789-790, p. 61-66, 2015.

TSAI, Y.P.; WU, K.J. Epigenetic regulation of hypoxia-responsive gene expression: focusing on chromatin and DNA modifications. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 2, p. 249-256, 2014.

TSE, G.M.; CHAN, A.W.; YU, K.H.; KING, A.D.; WONG, K.T.; CHEN, G.G.; TSANG, R.K.; CHAN, A.B. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Annals of surgical oncology**, v. 14, n. 12, p. 3558-3565, 2007.

VAN DEN BREKEL, M.W.M.; BINDELS, E.M.J.; BALM, A.J.M. Prognostic factors in head and neck cancer. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1041–1043, 2002.

VAN DER VEEN, J.; NUYTS, S. Can Intensity-Modulated-Radiotherapy Reduce Toxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma? **Cancers**, v. 9, n. 10, 2017.

WELLMANN, S.; BETTKOBER, M.; ZELMER, A.; SEEGER, K.; FAIGLE, M.; ELTZSCHIG, H.K.; BÜHRER, C. Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. **Biochemical and Biophysical**, v. 372, n. 4, p. 892-897, 2008.

WENDT, T.G.; BANK, P. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Onkologie**, v. 25, n. 3, p. 208-212, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health, 2014**. Geneva: World Health Organization; 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva: World Health Organization, 1996. 343 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies**. Geneva: World Health Organization; 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. International agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr>> Acesso em: 17 set. 2018.

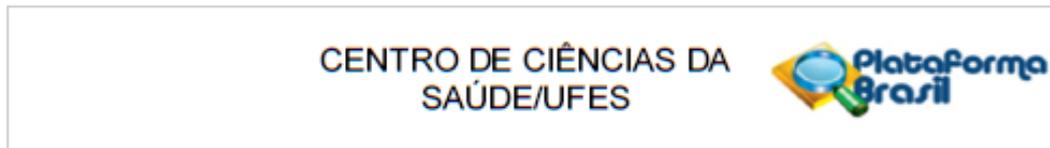
YANG, J.; LEDAKI, I.; TURLEY, H.; GATTER, K.C.; MONTERO, J.C.; LI, J.L.; HARRIS, A.L. Role of hypoxia-inducible factors in epigenetic regulation via histone demethylases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1177, p. 185–197, 2009.

ZHANG, H.; KIM, S.; CHEN, Z.; NANNAPANENI, S.; CHEN, A.; MOORE, C.; SICA, G.; MOSUNJAC, M.; NGUYEN, M.L.T.; D'SOUZA, G.; CAREY, T.E.; PETERSON, L.A.; MCHUGH, J.B.; GRAHAM, M.; KOMARCK, C.M.; WOLF, G.T.; WALLINE, H.M.; BELLILE, E.; RIDDELL, J.; PAI, S.I.; SIDRANSKY, D.; WESTRA, W.H.; WILLIAM, W.N.; LEE, J.J.; EL-NAGGAR, A.K.; FERRIS, R.L.; SEETHALA, R.; GRANDIS, J.R.; CHEN, Z.G.; SABA, N.F.; SHIN, D.M. Prognostic biomarkers in patients with human immunodeficiency virus-positive disease with head and neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 39, n. 12, p. 2433-2443, 2017.

XUE, J.; LI, X.; JIAO, S.; WEI, Y.; WU, G.; FANG, J. Prolyl Hydroxylase-3 is downregulated in Colorectal Cancer Cells and Inhibits IKKB Independent of Hydroxylase Activity. **Gastroenterology**, v.138, 2010; p. 606-615.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do CCS/UFES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS PESADOS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO, MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO

**Pesquisador:** ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 49091515.9.0000.5060

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.359.363

#### Apresentação do Projeto:

O projeto trata-se de ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS PESADOS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO, MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO.

#### Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador os objetivos são:

"Objetivo Primário:

Avaliar a impregnação de metais pesados em amostras de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, e a influencia do uso do tabaco, álcool, hábitos e a expressão gênica de genes de hipóxia e estresse oxidativo para correlação com a evolução da doença e a resposta ao tratamento.

Objetivos Secundários:

-Quantificar metais pesados nas amostras de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e correlacionar com a evolução clínica da doença e resposta ao tratamento e hábitos;

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.359.363

-Verificar a quantidade de metais pesados presente em tecidos tumorais e correlacionar com a expressão gênica dos genes de hipóxia e estresse oxidativo e correlacionar com a evolução clínica da doença e resposta ao tratamento;

-Analisar por meio de microscopia de transmissão (MET) a estrutura das células tumorais dos pacientes oncológicos e relacionar com a expressão gênica;

Realizar atividades educativas de prevenção do uso do tabaco, álcool e prevenção do câncer através da capacitação de agentes sociais e implantação de programa de prevenção."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o pesquisador, "a obtenção das amostras tumorais não acarretará riscos extras para o paciente porque corresponde aos fragmentos (blocos de parafina) não utilizados do tumor ou do material biológico retirado do paciente durante cirurgia ou biópsia. Desta forma, este material fica obrigatoriamente armazenado na Patologia do Hospital e não é identificado pelo nome do paciente o que ajuda a garantir a confidencialidade da identidade do sujeito do estudo. Em relação aos dados de prontuários que farão parte do estudo, sempre existe risco de identificação e vazamento de informação sigilosa do paciente. Para minimizar os riscos, este levantamento será feito por colaboradores de dentro das instituições envolvidas, o prontuário não sairá dos hospitais parceiros e receberemos apenas uma planilha identificada numericamente sem o nome ou qualquer identificação do paciente. Durante a coleta de dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados.

**Benefícios:** Não haverão benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os indivíduos analisados. Apesar disso, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência a partir dos dados obtidos, que poderão fazer parte do conhecimento científico, colaborando para a descoberta de novas terapias e estratégias. Segundo um dos objetivos da proposta, "Realização de atividades educativas de prevenção do uso do tabaco, álcool e prevenção do câncer através da capacitação de agentes sociais e implantação de programa de prevenção",

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES                      **Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.359.363

o projeto realizará intervenção social educativa. Para a população geral haverá um benefício direto decorrente da pesquisa, a realização de atividades educativas. Com a realização do programa de prevenção do uso do tabaco, álcool, drogas e prevenção de câncer.”

Os riscos e benefícios contemplam a Res CNS 466/12

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto tem relevância científica e social

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

No projeto ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS PESADOS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO, MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO do pesquisador ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA constam os seguintes documentos:

Folha de rosto: apresentada e adequada

Projeto detalhado: apresentado e adequado

Termo de Sigilo e Confidencialidade: apresentado e adequado

Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentada e adequada

Cronograma: apresentado e adequado

Orçamento: apresentado e adequado

Regulamentação de biorepositório: apresentado

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram atendidas todas as solicitações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_76141.pdf	09/12/2015 12:43:05		Aceito
Declaração de Manuseio Material	regulbiorepositorio.pdf	09/12/2015 12:41:46	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES **Município:** VITÓRIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.359.363

Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulbiorrepositorio.pdf	09/12/2015 12:41:46	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MetaisVersao3.pdf	09/12/2015 12:41:06	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaErasto.pdf	27/11/2015 14:41:35	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHECI.pdf	24/11/2015 09:10:08	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHeliopolis.pdf	24/11/2015 09:09:44	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartaCAVC.pdf	13/11/2015 21:41:33	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Outros	Termoconfidencialidadeetica.pdf	12/11/2015 10:52:57	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoBiorrepositorio.pdf	12/11/2015 10:51:05	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Novo Documento.pdf	30/07/2015 22:47:53		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

VITORIA, 09 de Dezembro de 2015

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ocs.ufes.br

## ANEXO 2. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do ICAVC

<b>INSTITUTO DO CÂNCER ARNALDO VIEIRA DE CARVALHO - ICACV</b>	
---	--

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS PESADOS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO, MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO

**Pesquisador:** ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 49091515.9.3002.5471

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.422.077

#### Apresentação do Projeto:

ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS PESADOS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO, MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE GENES DE HIPÓXIA E ESTRESSE OXIDATIVO

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a impregnação de metais pesados em amostras de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, e a influência do uso do tabaco, álcool, hábitos e a expressão gênica de genes de hipóxia e estresse oxidativo para correlação com a evolução da doença e a resposta ao tratamento. É objetivo da proposta realizar a prevenção do câncer e dos hábitos de risco como do uso do tabaco e do álcool através de um programa de prevenção.

Quantificar metais pesados nas amostras de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e correlacionar com a evolução clínica da doença e resposta ao tratamento e hábitos;- Verificar a quantidade de metais pesados presente em tecidos tumorais e correlacionar com a expressão gênica dos genes de hipóxia e estresse oxidativo e correlacionar com a evolução clínica da doença e resposta ao tratamento;- Analisar por meio de microscopia de transmissão (MET) a estrutura das

<b>Endereço:</b> Largo do Arouche, nº 66 - 10º andar	<b>CEP:</b> 01.219-000
<b>Bairro:</b> República	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO
<b>Telefone:</b> (11)3221-5187	<b>Fax:</b> (11)3221-5187
	<b>E-mail:</b> cep@doutoramaldo.org

**INSTITUTO DO CÂNCER  
ARNALDO VIEIRA DE  
CARVALHO - ICACV**



Continuação do Parecer: 1.422.077

células tumorais dos pacientes oncológicos e relacionar com a expressão gênica;- Realização de atividades educativas de prevenção do uso do tabaco, álcool e prevenção do câncer através da capacitação de agentes sociais e implantação de programa de prevenção.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A obtenção das amostras tumorais não acarretará riscos extras para o paciente porque corresponde aos fragmentos (blocos de parafina) não

utilizados do tumor ou do material biológico retirado do paciente durante cirurgia ou biópsia. Desta forma, este material fica obrigatoriamente

armazenado na Patologia do Hospital e não é identificado pelo nome do paciente o que ajuda a garantir a confidencialidade da identidade do sujeito do estudo. Em relação aos dados de prontuários que fazem parte do estudo, sempre existe risco de identificação e vazamento de informação sigilosa do paciente. Para minimizar os riscos, este levantamento será feito por colaboradores de dentro das instituições envolvidas, o prontuário não sairá

dos hospitais parceiros e receberemos apenas uma planilha identificada numericamente sem o nome ou qualquer identificação do paciente. Durante a coleta de dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados.

**Benefícios:** para o sujeito da pesquisa não haverá nenhum benefício direto decorrente dos estudos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O Protocolo de Pesquisa foi Aprovado e está dentro das resoluções.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O Protocolo de Pesquisa foi Aprovado .

**Recomendações:**

Entregar Relatórios semestralmente ao CEP-ICAVC e manter o CEP-ICAVC sempre informado sobre o andamento do Estudo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado , Entregar relatórios semestralmente ao CEP-ICAVC e manter o CEP-ICAVC sempre informando sobre o andamento do Estudo.

<b>Endereço:</b> Largo do Arco, nº 66 - 10º andar	<b>CEP:</b> 01.219-000
<b>Bairro:</b> República	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO
<b>Telefone:</b> (11)3221-5187	<b>Fax:</b> (11)3221-5187
	<b>E-mail:</b> cep@doutoramaldo.org

**INSTITUTO DO CÂNCER  
ARNALDO VIEIRA DE  
CARVALHO - ICACV**



Continuação do Parecer: 1.422.077

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_76141.pdf	09/12/2015 12:43:05		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	regulbiorrepositorio.pdf	09/12/2015 12:41:46	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MetaisVersao3.pdf	09/12/2015 12:41:06	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_76141.pdf	27/11/2015 14:50:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MetaisVersao2.pdf	27/11/2015 14:49:19	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaErasto.pdf	27/11/2015 14:41:35	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHECI.pdf	24/11/2015 09:10:08	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHeliopolis.pdf	24/11/2015 09:09:44	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartaCAVC.pdf	13/11/2015 21:41:33	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Outros	Termoconfidencialidadeetica.pdf	12/11/2015 10:52:57	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermoBiorrepositorio.pdf	12/11/2015 10:51:05	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_76141.pdf	10/09/2015 15:34:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MetaisCECP.pdf	10/09/2015 15:32:46	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Novo Documento.pdf	30/07/2015 22:47:53		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Largo do Aruache, nº 66 - 10º andar  
 Bairro: República CEP: 01.219-000  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3221-5187 Fax: (11)3221-5187 E-mail: cep@doutoramaldo.org

INSTITUTO DO CÂNCER  
ARNALDO VIEIRA DE  
CARVALHO - ICACV



Continuação do Parecer: 1.422.077

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 24 de Fevereiro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Carlos Elias Fristachi**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Largo do Arouche, nº 66 - 10º andar  
**Bairro:** República **CEP:** 01.219-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3221-5187 **Fax:** (11)3221-5187 **E-mail:** cep@doutorarnaldo.org

## ANEXO 3. Comprovante de submissão de artigo 1

20/09/2018

Gmail - Track your recent Co-Authored submission to OO



Anderson Barros Archanjo &lt;andersonarchanjo@gmail.com&gt;

### Track your recent Co-Authored submission to OO

1 mensagem

O Oncology Editorial Office <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
 Responder a: O Oncology Editorial Office <ooncology@elsevier.com>  
 Para: andersonarchanjo@gmail.com

20 de setembro de 2018 00:05

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Anderson Archanjo,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Oral Oncology

Title: ELEMENTAL CHARACTERIZATION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH PROGNOSIS AND SURVIVAL

Corresponding Author: Mayara de Oliveira

Co-Authors: Anderson B Archanjo; Arícia L Assis, ME; Suzanny Oliveira Mendes O Mendes, Phd; Rafael P de Souza; Rafael de Cicco; Aline R Borçoi, ME; Júlia A Pinheiro, ME; Lucas L Maia, Phd; Gabriela T Peterle, Phd; Kelly C Saito; Edna T Kimura, Phd; Marcos B Carvalho, Phd; Fábio D Nunes, Phd; Eloiza Tajara, Phd; Marcelo dos Santos, Phd; Breno V Nogueira, Phd; Leonardo O Trivilin, Phd; Christiano J Gomes Pinheiro, Phd; Adriana M Álvares-da-Silva, Phd

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/oo/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Anderson&lname=Archanjo&email=andersonarchanjo@gmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/oo/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=andersonarchanjo@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at [mayaraifes@gmail.com](mailto:mayaraifes@gmail.com); [mayara\\_motta\\_@hotmail.com](mailto:mayara_motta_@hotmail.com).

Thank you,

Oral Oncology

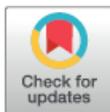
## ANEXO 4. Comprovante de publicação de artigo 2



## RESEARCH ARTICLE

# JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma

Lucas de Lima Maia<sup>1\*</sup>, Gabriela Tonini Peterle<sup>1</sup>, Marcelo dos Santos<sup>2</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>1</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Mayara Mota de Oliveira<sup>1</sup>, Joaquim Gasparini dos Santos<sup>1</sup>, Elaine Stur<sup>1</sup>, Lidiane Pignaton Agostini<sup>1</sup>, Cinthia Vidal Monteiro da Silva Couto<sup>1</sup>, Juliana Dalbó<sup>1</sup>, Aricia Leone Evangelista Monteiro de Assis<sup>1</sup>, Anderson Barros Archanjo<sup>1</sup>, Ana Maria Da Cunha Mercante<sup>3</sup>, Rossana Veronica Mendoza Lopez<sup>4</sup>, Fábio Daumas Nunes<sup>5</sup>, Marcos Brasilino de Carvalho<sup>6</sup>, Eloiza Helena Tajara<sup>7</sup>, Iúri Drumond Louro<sup>1</sup>, Adriana Madeira Álvares-da-Silva<sup>1</sup>



**1** Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil, **2** Escola Multicampi de Ciências Médicas do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Caicó, Rio Grande do Norte, Brazil, **3** Departamento de Anatomia Patológica, Hospital Heliópolis, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **6** Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Heliópolis, São Paulo, São Paulo, Brazil, **7** Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

\* [lucas\\_imbio@hotmail.com](mailto:lucas_imbio@hotmail.com)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Maia LdL, Peterle GT, dos Santos M, Trivilin LO, Mendes SO, de Oliveira MM, et al. (2018) JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. PLoS ONE 13(3): e0194884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194884>

**Editor:** Dajun Deng, Beijing Cancer Hospital, CHINA

**Received:** September 9, 2017

**Accepted:** March 12, 2018

**Published:** March 28, 2018

**Copyright:** © 2018 Maia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (<http://www.fapesp.br/>) grants 04/12054-9; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (<http://cnpq.br/>); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) (<https://fapes.es.gov.br/>); and the Coordenação de Aperfeiçoamento de

## Abstract

### Aims

Jumonji Domain-Containing 1A (JMJD1A) protein promotes demethylation of histones, especially at lysin-9 of di-methylated histone H3 (H3K9me2) or mono-methylated (H3K9me1). Increased levels of H3 histone methylation at lysin-9 (H3K9) is related to tumor suppressor gene silencing. *JMJD1A* gene target Adrenomedullin (ADM) has shown to promote cell growth and tumorigenesis. JMJD1A and ADM expression, as well as H3K9 methylation level have been related with development risk and prognosis of several tumor types.

### Methods and results

We aimed to evaluate JMJD1A, ADM, H3K9me1 and H3K9me2 expression in paraffin-embedded tissue microarrays from 84 oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma samples through immunohistochemistry analysis. Our results showed that nuclear JMJD1A expression was related to lymph node metastasis risk. In addition, JMJD1A cytoplasmic expression was an independent risk marker for advanced tumor stages. H3K9me1 cytoplasmic expression was associated with reduced disease-specific death risk. Furthermore, high H3K9me2 nuclear expression was associated with worse specific-disease and disease-free survival. Finally, high ADM cytoplasmic expression was an independent marker of lymph node metastasis risk.