



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

ARÍCIA LEONE EVANGELISTA MONTEIRO DE ASSIS

**RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DE ESTRESSE
OXIDATIVO COM ELEMENTOS TRAÇOS, HÁBITOS DE
VIDA E PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL**

Orientador Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Coorientadora: Prof^a. Dr. Adriana Madeira da Silva

VITÓRIA/ES

2019

ARICIA LEONE EVANGELISTA MONTEIRO DE ASSIS

**RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DE ESTRESSE
OXIDATIVO COM ELEMENTOS TRAÇOS, HÁBITOS DE
VIDA E PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA/ES

2019

	Sobrenome do autor, Prenome do autor
* Cutter	Título do trabalho / Nome por extenso do autor. -- local, ano.
	xx (total de folhas antes da introdução em nº romano), 50f.(total de folhas do trabalho): il. ; (caso tenha ilustrações) 29 cm.(tamanho do papel A4)
	Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em nome do curso) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus, local, ano.
	Orientador (a): Prof.(a) titulação e nome do prof(a).
	1. Assunto x. 2. Assunto xx. 3. Assunto xxx. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	* CDD

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIB/UFES

Bibliotecário:

TERMO DE APROVAÇÃO

ARÍCIA LEONE EVANGELISTA MONTEIRO DE ASSIS

RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DE ESTRESSE OXIDATIVO COM ELEMENTOS TRAÇOS, HÁBITOS DE VIDA E PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL

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 09 de Maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Breno Valentin Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
RENORBIO
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
RENORBIO
(Coorientadora)

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
RENORBIO
(Examinador Interna)

Prof.^a Dr. Marcos Brasilino de Carvalho
Programa de Oncologia da Faculdade de Medicina
da USP
(Examinador Externo)

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

Sempre a Deus, por estar ao meu lado e de toda minha família, me auxiliando e guiando meus passos.

A minha família, meu pai Nelson Monteiro, minha mãe Rosemara Leone e minha irmã Marina Leone, que sempre estiveram ao meu lado na minha caminhada e nas minhas escolhas, amor incondicional. Aos meus avós, Chico e Natil, Alice e Waldir, presentes que Deus me dá a oportunidade de conviver e sempre aprender.

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira e minha orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana Madeira Álvares da Silva, por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho.

Ao professor e amigo Dr. Leonardo Oliveira Trivilin, por me ajudar em todos os momentos de desespero e dúvidas, me acalmar e sempre me guiar nos melhores caminhos. Um anjo da guarda!!

A Prof. Dr.^a Edna Teruko Kimura, por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular da Glândula Tiróide, para a confecção dos *tissue microarrays* e a Dr.^a 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.^a Dr.^a Eloíza Helena Tajara, coordenadora do projeto do Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, pela contribuição na realização deste trabalho.

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, por caminharem ao meu lado nessa jornada. Em especial o Anderson Barros (amigo!!) por todos os momentos de desenvolvimento do projeto, por discutir comigo todas as dúvidas e sempre estar ao meu tanto no meio acadêmico quanto na vida pessoal. A Suzanny, Mayara, Juliana, Joaquim, Ivana e Aline pela colaboração nas análises, discussões de tese e pelos momentos descontraídos e animadores.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, por todos os acréscimos no desenvolvimento do projeto, que foram cruciais e por momentos de descontração.

Ao Laboratório de Patologia Animal, em especial as professoras Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes, Dr.^a Jankerle Neves Boeloni, pela disponibilização do laboratório e as dicas e colaboração nas análises.

Aos amigos que a vida me deu Roberta Paschoa, Clemilton Alves, Natália Grancieri, da faculdade para a vida. A todos os meus amigos, que são especiais na minha vida, não quero citar nomes para não esquecer ninguém!!!

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, participaram da realização desse trabalho.

Obrigada, de coração!!!!

“Só existem
dois dias no ano que nada
pode ser feito. Um se
chama ontem e o outro se
chama amanhã, portanto
hoje é o dia certo para
amar, acreditar, fazer e
principalmente viver.

Dalai Lama

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células escamosas de cavidade oral é uma doença multifatorial com forte associação com o uso do tabaco, que possui entre seus constituintes metais e metalóides, responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). A perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs é chamada de estresse oxidativo e pode levar a danos no DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer. No entanto, as células contam com mecanismos antioxidantes para a manutenção da homeostasia oxidativa e de reparo caso o dano ocorra no DNA. Dessa forma, o estudo teve como principal objetivo entender os mecanismos e interações celulares de enzimas de estresse oxidativo e reparo e sua associação com características epidemiológicas e elementos presentes nas amostras tumorais. **Casística e Métodos:** Nesse contexto a proposta buscou estudar tumores de 78 pacientes com câncer oral quanto às interações biológicas das proteínas envolvidas no estresse oxidativo (SOD-1 e Trx) e de reparo (Ref-1 e OGG1/2), além de avaliar suas associações com características epidemiológicas e prognósticas e a presença de elementos químicos nos tecidos tumorais. Para tanto, foi realizada análise da expressão das proteínas por meio da imunohistoquímica, caracterização elementar por μ -XRF e verificadas as associações com características epidemiológicas e prognósticas dos pacientes. **Resultados:** As análises das interações proteicas com metais e estilo de vida mostraram que o hábito tabagista está associado com o aumento da expressão de SOD-1, OGG1/2 e Trx, o elemento cromo esteve associado com Ref-1 e Trx, o níquel com Ref-1 e magnésio com OGG 1/2. Foi possível observar também uma forte interação proteína-proteína de OGG 1/ 2 com SOD-1. Já os resultados mais voltados para o prognóstico do paciente foi possível constatar que os elementos de cloro e cromo foram relacionados à recorrência do tumor. A invasão perineural e vascular foram indicadores importantes para agressão e prognóstico tumoral e a expressão de SOD-1, Trx e Ref-1 mostrou relação

prognóstica com o crescimento tumoral. O hábito alcoólico e invasão vascular tiveram impacto na sobrevida livre de doença e específica para doença.

Conclusões: Os dados levam a uma melhor compreensão da atuação dos elementos químicos, absorvidos por meio do hábito tabagista, na possível modulação da expressão das proteínas de estresse oxidativo e reparo do DNA e sua associação com as características clinicopatológicas e prognósticas dos pacientes.

Palavras-chave: Cancer oral; estresse oxidativo; metais; enzimas de reparo; prognóstico.

ABSTRACT

Introduction: Squamous cell carcinoma of the oral cavity is a multifactorial disease with a strong association with the use of tobacco, which has metal and metalloid constituents responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS). The loss of balance between production and elimination of ROS is called oxidative stress and can lead to damage in DNA, RNA, lipids and proteins. In addition to DNA fragmentation, ROS can cause the DNA repair system to malfunction, contributing to the development of diseases, such as cancer. However, the cells have antioxidant mechanisms for the maintenance of oxidative homeostasis and repair if the damage occurs in the DNA. Thus, the main objective of this study was to understand the mechanisms and cellular interactions of oxidative stress and repair enzymes and their association with epidemiological characteristics and elements present in the tumor samples.

Casuistry and methods: In this context, the proposal sought to study tumors of 78 patients with oral cancer related to the biological interactions of proteins involved in oxidative stress (SOD-1 and Trx) and repair (Ref-1 and OGG1 / 2), besides evaluating its associations with epidemiological and prognostic characteristics and the presence of chemical elements in the tumor tissues. In order to do so, we analyzed the expression of the proteins by means of immunohistochemistry, elemental characterization by μ -XRF and verified the associations with epidemiological and prognostic characteristics of the patients.

Results: The analysis of the metal and lifestyle protein interactions showed that the smoking habit is associated with increased expression of SOD-1, OGG1 / 2 and Trx, the chromium element was associated with Re-1 and Trx, nickel with Ref-1 and magnesium with OGG 1/2. It was also possible to observe a strong protein-protein interaction of OGG 1/2 with SOD-1. On the other hand, the results more focused on the prognosis of the patient, it was possible to verify that the elements of chlorine and chromium were related to the recurrence of the tumor. Perineural and vascular invasion were important indicators for aggression and tumor prognosis, and expression of SOD-1, Trx and Ref-1

showed a prognostic relationship with tumor growth. The alcoholic habit and vascular invasion had an impact on disease-free and disease-specific survival.

Conclusions: The data lead to a better understanding of the performance of the chemical elements, absorbed through the smoking habit, in the possible modulation of the expression of proteins of oxidative stress and DNA repair and its association with the clinicopathological characteristics and Prognostic of the patients.

Key words: Oral câncer; oxidative stress; metals, repair enzymes; prognosis.

LISTA DE ILUSTRÇÕES

Figura 1: Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo (Adaptado de Ercal et al., 2001).	20
Figura 2- Uma representação esquemática do reparo de bases oxidadas no DNA pela via BER.O estresse oxidativo pode resultar em lesões de bases oxidadas no DNA, como por exemplo , formação de 8-oxoguanina (8-oxoG). A DNA glicolase OGG1 é capaz de remover a lesão do tipo 8-oxoG deixando um sitio AP. Em seguida, APE1/REF-1 promove a incisão na região 5' do esqueleto açúcar-fosfato no sitio AP, deixando um agrupamento nativo não oxidado 5-fosfatodesoxirribose (dRP) ou um grupo 3'-OH próximo ao espaço do nucleotídeo. A ponte com um grupo não oxidado é reparado pela sub via SN-BER (1), ao passo que a extremidade com o açúcar oxidado pode se reparado pelo sub via LP-BER (2a e 2b). (1) Os próximos passos da via curta são a adição de um nucleotídeo na lacuna gerada e remoção do agrupamento 5'-dRP pela DNA polimerase β ($pol\beta$). Subsequentemente, a $pol\beta$ promove o preenchimento da lacuna deixando um intermediário de DNA livre para ligação. Neste cenário, o reparo envolve uma substituição de apenas um nucleotídeo por isso é a via SN-BER. (2) Para o cenário onde o açúcar oxidado é resistente a atividade de dRP liase da $pol\beta$ o reparo desses intermediários bloqueados pode seguir pela via longa BER, a qual envolve a resíntese de um oligonucleotídeos de comprimento. A síntese de DNA nesta via é realizada por diversas polimerases e requer fatores de replicação e o produto final do DNA reparado é selado por uma ligase. Dependente da quantidade de substituição de nucleotídeos necessários que é recrutado o aparato enzimático específico. (Adaptado de Liu e Wilson, 2012).	26
Figura 3: O Esquema das atividades da oxidoredutase do sistema tiorredoxina. A figura mostra esquematicamente a redução da tiorredoxina oxidizada no local ativo, Trx-S ₂ , a um ditiol na tiorredoxina reduzida, Trx- (SH) ₂ , pela tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH. Trx- (SH) ₂ reduz os sulfuretos de proteína pela sua atividade geral de oxidoredutase, gerando Trx-S ₂ . Adaptado (Arner e Holmgren, 2000).	29
Figura 4- Papel do estresse oxidativo e proteínas de reparo do DNA nas células (modificado de CURTIS et al., 2010).	32
Figura. 1 Imunomarcção de um <i>spot</i> , onde é possível observar a intensidade de marcação forte nos núcleos e intensidade fraca de marcação no citoplasma da proteína Ref-1 (A). Imunomarcção citoplasmática de intensidade fraca SOD-1 (B). Imunomarcção citoplasmática e nuclear de intensidade forte da proteína Trx (C). Imunomarcção nuclear forte da proteína OGG1/2 em carcinoma epidermóide de cavidade oral (D). Magnificações originais de 100x (A) e 400x (B, C e D).....	47

Figura 1: (A) Disease-free survival curve of patients with oral squamous cell carcinoma according to perineural invasion. (B) Disease-specific survival curve according to vascular invasion. (C) Disease-specific survival according to current alcohol consumption. Disease-free survival curve according to the chlorine element (D)..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral.....	42
Tabela 2: Caracterização elementar das amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral.....	46
Tabela 3: Análise multivariada da expressão da proteína SOD-1 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.	49
Tabela 4: Análise multivariada da expressão da proteína Ref-1 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.	51
Tabela 5: Análise multivariada da expressão da proteína OGG1/2 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.	52
Tabela 6: Análise multivariada da expressão da proteína Trx em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.	53
Table 1: Epidemiological, clinicopathological and prognostic characteristics of patients with oral squamous cell carcinoma.....	69
Table 2: Multivariate analysis concerning lymph node, tumor size, aggressiveness and vascular invasion with clinicopathological characteristics, life habits and protein expression.	73
Table 3: Multivariate analysis between prognostic, clinicopathological characteristics, life habits and protein expression	75
Table 4: Multivariate analysis disease recurrence and disease-specific survival with life habits, clinicopathological characteristics, elemental characterization and protein expression.	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Aspectos gerais	17
3.2 Metais e metalóides na saúde e em sistemas biológicos	19
3.3 Via do estresse oxidativo/ Danos ao DNA	20
3.5 Superóxido Dismutase (SOD 1).....	22
3.6 DNA Glicosilase OGG1 e OGG2.....	23
3.7 Endonuclease apurínica/apirimidínica/fator redox (APE-1/Ref-1)	25
3.8 Sistema da tiorredoxina	28
3.9 Fatores prognósticos	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 1: INTERELAÇÕES PROTÉICAS, ELEMENTARES E ESTILO DE VIDA EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	37
Resumo	38
INTRODUÇÃO	39
Material e métodos.....	41
Aspectos éticos	41
Casuística e amostras	41
Tissue microarrays	42
Caracterização elementar	43
Reação de imunohistoquímica	44
Análise Estatística	45
Resultados.....	45
Caracterização elementar	45
Análises das expressões das proteínas	47
Padrão de expressão das proteínas versus estilo de vida e elementos	48
Discussão	54
Conclusão.....	57
Referências.....	58

CAPÍTULO 2: CHLORINE AND CHROMIUM ELEMENTS AND PROTEINS OF OXIDATIVE STRESS AND DNA REPAIR PATHWAYS ARE RELATED TO TUMOR AGGRESIVENESS AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH ORAL CANCER.....	63
Abstract.....	65
Introduction	66
Casuistry and methods.....	67
Ethics	67
Sample	68
Tissue microarrays	70
Elementary Characterization.....	70
Immunohistochemistry	70
Statistical Analysis	71
Results	72
Discussion	79
Conclusion.....	83
Acknowledgements.....	83
References.....	84
5.0 CONCLUSÃO GERAL.....	91
ANEXOS	92
ANEXO 1. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do CCS/UFES.....	93
ANEXO 2. Comprovante de aprovação do Comitê de Ética do ICAVC	97
ANEXO 2. Comprovante de submissão do artigo 1	101
ANEXO 3. Comprovante de submissão do artigo 2	102
.....	102

1. INTRODUÇÃO

Está comprovada a relação do ato de fumar e o aparecimento de cânceres na cavidade oral e na laringe, bem como em locais mais distantes, a saber, estômago, pâncreas, bexiga urinária e intestino (SAMET e WANG, 2000). Existem entre 60 e 70 substâncias cancerígenas na fumaça liberada dos derivados do tabaco, dentre eles estão os metais e semi metais, tais como: arsênico, níquel, cádmio e polônio 210. Sendo, portanto, o tabaco um carcinógeno com efeito mutagênico e de proliferação celular (ROSEMBERG, 2002 apud MEIRELLES, 2010). O estresse oxidativo está entre os mecanismos mais documentados da utilização do tabaco, e as substâncias que o compõem são as principais causadoras desse desbalanço celular (BANDEIRA et al., 2018).

O estresse oxidativo refere-se a um sério desbalanço entre a produção das espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante, englobando um amplo espectro de condições que alterem o estado redox celular (HALLIWEL & WHITEMAN, 2004).

Com a finalidade de evitar danos celulares induzidos pela ERO, as células dependem de um conjunto diverso de proteínas para diminuir o estresse oxidativo e, se o dano ocorrer, para reparar o dano induzido por ERO. Enzimáticas tais como, superóxido dismutase (SOD), Tirredoxina (Trx), Ref-1, OGG1 desempenham papel crucial na proteção celular (OBERLEY et al., 1979; MATES et al., 2000; EVANS et al., 2000; ELAHI et al., 2002; LINCOLN et al. 2003).

O estresse oxidativo atualmente é um grande foco de estudos devido ao fato de sua presença ser a causa ou evento comum a vários estados patológicos (REUTER et al., 2010). Dentre estes se encontra o câncer, em geral, o tratamento do câncer, é baseado em uma estratégia de multimodalidade, comumente envolvendo cirurgia, quimioterapia e radioterapia (SHAH et al., 2009).

No entanto, estudos que visem entender os mecanismos celulares em condições de estresse oxidativo ajudariam a elucidar o entendimento do comportamento tumoral no prognóstico desses pacientes. Desta forma, questionamos se os componentes do tabaco, enzimas da via de estresse oxidativo e

reparo, além das características epidemiológicas e clínico patológicas, interferem na evolução e prognóstico do câncer oral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a expressão de proteínas de controle e reparo do DNA e via de sinalização de estresse oxidativo e verificar a influência dos elementos traço, bem como sua correlação com características histopatológicas, prognósticas, hábitos de vida de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização das amostras de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral, tratados cirurgicamente;
- Caracterizar os elementos químicos presentes nas amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço;
- Avaliar a expressão das seguintes proteínas relacionadas à via de estresse oxidativo: SOD-1 e Trx e reparo de DNA: Ref-1 e OGG1/2 e os possíveis mecanismos de interação entre as proteínas nos pacientes;
- Relacionar a caracterização com a expressão das proteínas do estudo, bem como sua correlação com características histopatológicas, prognósticas, hábitos de vida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é caracterizado por lesões malignas que acometem os tecidos orais (MASSANO et al., 2006). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou para 2018 a ocorrência de 14.700, sendo 11.200 homens e 3.500 mulheres. É o quinto câncer mais frequente em homens e o nono em mulheres, no país. Por regiões, entre os homens, é o quarto mais frequente na região Sudeste, o quinto nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, o sexto na região Sul e o sétimo na região Norte. Entre as mulheres é o nono mais frequente na região Nordeste, o décimo na região Sudeste, o 12º nas regiões Norte e Centro-Oeste e o 15ª na região Sul (INCA, 2015).

Mediante ao aperfeiçoamento dos exames e da melhora nos tratamentos nas últimas três décadas, somente 40%-50% dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) sobrevivem por mais de 5 anos após o diagnóstico (LEEMANS et al., 2011; STRANSKY et al., 2011; ZHU et al., 2015).

Döbrössy (2005), afirma que um dos principais subgrupos de carcinomas de cabeça e pescoço é o câncer oral, envolvendo 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. Os fatores de risco que estão comumente associados a esse tipo de neoplasia são: o consumo excessivo de tabaco e álcool. Além disso, está aumentando o número de evidências que relatam o papiloma vírus (HPV) como agente causador de subtipos específicos de carcinoma epidermóide (CE).

A *Global Burden of Disease Cancer Collaboration* afirma que para o ano de 2015, 410 mil pessoas foram acometidas e 146 mil morreram por este tipo de tumor. De acordo Ferlay et al. (2015), em todo mundo ocorreram 145 mil mortes (1,8% do total mundial), das quais 77% nas regiões menos desenvolvidas. O carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide representa mais de 90% dos casos

de tumores da cavidade oral, faringe e laringe, dentre as variantes histológicas (LEEMANS et al., 2011; BAXIS et al., 2014).

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; BAXIS et al., 2014).

Estudos revelam que o álcool e o fumo são fatores etiológicos potenciais para o surgimento do câncer de boca mesmo em indivíduos com idade inferior a 45 anos (IARC, 1988; IARC, 2004, KUMAR et al., 2016). A associação entre o fumo e o álcool na etiologia do câncer de boca está relacionada com o efeito de aumento da permeabilidade causado pelo álcool, que pode ocasionar um aumento da penetração dos carcinógenos presentes no tabaco (CONWAY et al., 2018; DU et al., 2000).

O uso do tabaco é, de longe, a mais difundida ligação entre a exposição à carcinógenos conhecidos e morte por câncer e, portanto, é um modelo para a compreensão dos mecanismos de indução do câncer (HECHT, 2003). 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 em genes relacionados ao câncer.

O cigarro é um fator de risco e sua fumaça contém mais de 7000 substâncias químicas, muitas das quais podem contribuir para os efeitos reforçadores do tabaco dentre essas substâncias destacam-se os metais e metalóides não essenciais para sistemas biológicos. Estudar essa interação entre o hábito tabagista e etilista nas modificações celulares é de suma importância para compreensão do microambiente tumoral e sua progressão (BANDEIRA et al., 2018; CONDOLUCI et al., 2016; STEWART e WILD, 2014).

3.2 Metais e metalóides na saúde e em sistemas biológicos

Elementos-traço geralmente representam menos de um por cento da massa de um material (CESAREO, 1988). 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).

Como já mencionado alguns metais e metalóides são componentes essenciais nos organismos desempenham funções em processos bioquímicos e afetam profundamente, seja porque são essenciais ou tóxicos quando presentes em quantidades excessivas (VALKO e MORRIS, 2005). Portanto para a homeostase os metais e metalóides devem estar presentes em uma estreita faixa de concentração e fortemente regulados nos sistemas biológicos, visto que quaisquer alterações nas concentrações podem ser danosas e induzir desordens patológicas. (SCHWARTZ, 1975; 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).

Estudos focam na toxicidade e na carcinogenicidade induzida por metais, enfatizando seu papel na geração de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos, a formação de radicais livres mediada por metais pode causar varias modificações na bases do DNA, aumento da peroxidação lipídica e mudanças na homeostase do cálcio e do sulfidril (VALKO et al., 2005; CHEN et al., 2001) (Figura 1).

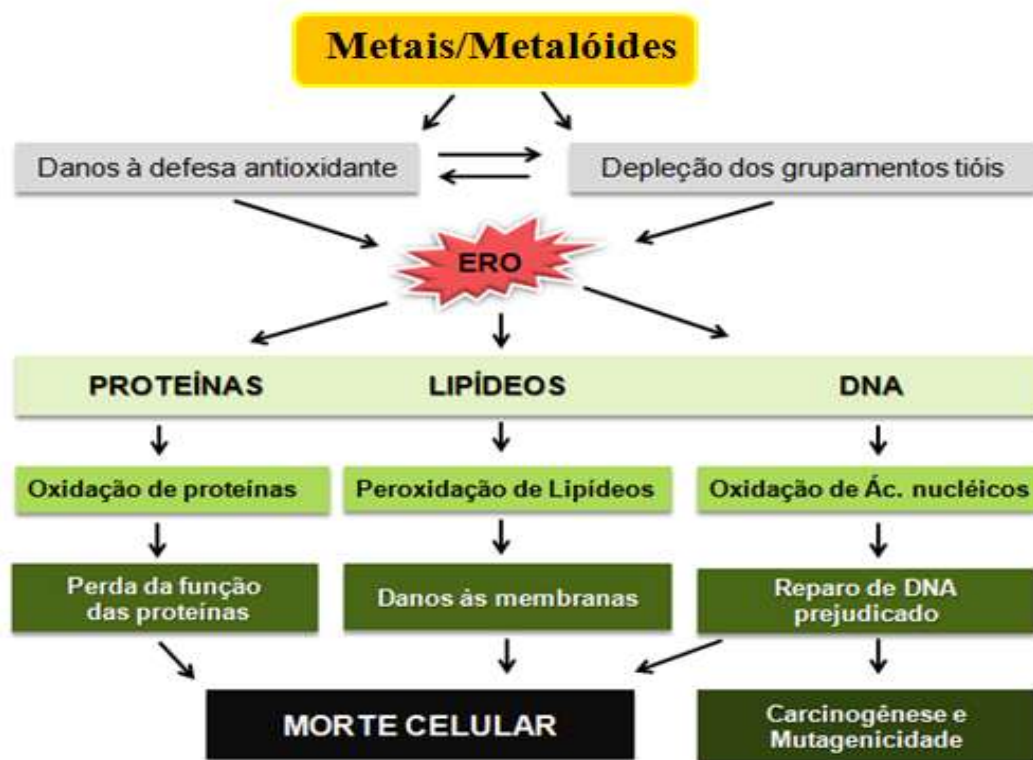


Figura 1: Possíveis mecanismos de indução ao estresse oxidativo (Adaptado de Ercal et al., 2001).

3.3 Via do estresse oxidativo/ Danos ao DNA

O estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) é um mecanismo bem conhecido de danos induzidos por metais pesados (TCHOUNWOU et al., 2012; BÁNFALVI, 2011). O estresse oxidativo refere-se à condição a qual há um grave desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção das espécies reativas de oxigênio, sendo um dos mecanismos mais documentados de toxicidade e carcinogenicidade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Um dos principais locais geradores de espécies reativas ocorre na mitocôndria durante o processo de fosforilação oxidativa, no qual elétrons são transferidos sequencialmente do oxigênio e água é produzida no complexo IV da mitocôndria. No entanto, uma pequena proporção do oxigênio é reduzida parcialmente, visto que, as proteínas que fazem parte da cadeia fosforilativa possuem centros redox que transportam apenas um elétron de cada vez. Cerca de

0,1% a 4% não chega a ser completamente reduzido a água, ou seja, havendo uma disfunção da transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Nesse processo existe a formação de espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (TURRENS, 1997; WANG et al., 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

De acordo com De Viscaya-Ruiz et al. (2008), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o oxigênio *singlet* (1O_2), advindos da molécula de O_2 são os principais agentes do estresse oxidativo e da sinalização oxidativa. Dentre os citados o ânion superóxido é considerado o radical livre primário, que pode reagir com outras moléculas gerando outras espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 e OH^{\cdot} diretamente ou via enzimas e, processos catalisados por metais. O ânion superóxido produzido pode ser reduzido a peróxido de hidrogênio via enzima superóxido dismutase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), o peróxido de hidrogênio é considerado uma espécie reativa, pois não é carregado, é pouco reativo, penetra pelas membranas e apresenta citotoxicidade em altas concentrações. É decomposto pela enzima catalase ou pela glutathione peroxidase formando água. Através da presença de metais reduzidos como Fe^{+2} e Cu , pela reação de Fenton, o H_2O_2 produz o radical hidroxil que é um agente altamente oxidante que interage com moléculas incluindo o DNA, proteínas, lipídeos, açúcares e metais (STOREY, 1996; VALAVANIDIS et al., 2006).

Dentro desse contexto, os metais de transição no alcatrão da fumaça do cigarro são notáveis por causa de sua capacidade promover a formação de radicais hidroxila via reação de Fenton (WOOTEN et al., 2006). Os metalóides como, por exemplo, o arsênio presente no meio induz alterações na integridade mitocondrial e rápido declínio em seu potencial de membrana. Mediante a essas alterações as mitocôndrias são consideradas sítios primários que produzem uma incontrolável formação de ânion superóxido, combinada com uma diminuição nas defesas antioxidantes. Consequentemente resulta no aumento da sensibilidade das células ao arsênio (COHEN et al., 2006).

3.5 Superóxido Dismutase (SOD 1)

Devido ao potencial tóxico das ERO, os organismos desenvolveram complexos sistemas antioxidantes para se sobreviver neste ambiente oxidativo. Além disso, estudos recentes têm mostrado que as células aeróbicas também podem utilizar as ERO na sinalização celular, modulando diversos processos celulares como diferenciação, proliferação e morte (BIRBEN et al., 2012; SIES et al., 2017).

Halliwell e Gutteridge (2007) descrevem que a superóxido dismutase pertence a uma família de enzimas cuja função é catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio nos diversos compartimentos celulares.

Existem três formas distintas de superóxido dismutase encontradas em células humanas: a CuZnSOD (SOD-1, dependente de cobre e zinco), a MnSOD (SOD-2, dependente de manganês), intracelulares, e a CuZnSOD (SOD-3, dependente de cobre e zinco) extracelular. A SOD 1 localiza-se no citoplasma, no compartimento nuclear e nos lisossomas. A SOD 2 está localizada na mitocôndria e a SOD 3 localiza-se no plasma, linfa, ascite e fluido cérebrospinal. Na defesa intracelular contra as reações oxidativas as enzimas superóxido dismutase Cobre/Zinco (SOD-1) e a superóxido dismutase dependente de manganês (SOD-2) são as primeiras e mais importantes enzimas intracelulares (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000; ZELKO et al., 2002; HUANG et al., 2000).

A SOD-1 dependente de cobre e zinco é um homodímero de 32-kDa, com 153 aminoácidos e um íon de cobre e um de zinco por sítio ativo em cada subunidade. Além disso, necessita de estabilidade para a catálise que é dada pela estrutura quaternária da proteína, bem como a ligação dos dois íons metálicos (cobre e zinco) posicionados no núcleo catalítico (TRUMBULL; BECKMAN, 2009; PERRY et al., 2010).

Diversos autores afirmam que inúmeros fatores regulam a expressão de SOD, em especial aqueles sensíveis ao estresse oxidativo, tais como a proteína AP-1 e o NF-Kb que são componentes importantes da resposta celular em situação de

estresse oxidativo e decisivos nas questões de sobrevivência ou morte celular (KARIN, 1999; SHAULIAN e KARIN, 2002; BUBICI et al., 2006).

Estudos relatam que a expressão da SOD aumenta a agressividade e o potencial invasivo de células malignas em alguns tipos de cânceres (CONNOR et al., 2007; NELSON et al., 2003; SALZMAN et al., 2007). Células cancerígenas parecem ter um nível baixo de ERO devido à maior expressão de moléculas de eliminação de radicais livres como SOD 1 (CASARIL et al., 1994, WANG et al., 2005). De acordo com Jin et al., (2001), esse aumento no meio intracelular pode promover mecanismos de resistência à radioterapia, visto que, SOD-1 está envolvida na detoxificação celular por transformar os radicais livres (tóxicos) em peróxidos (não tóxicos). Em contraste, um suprimento insuficiente de enzimas antioxidantes no meio intracelular, especialmente SOD-1 pode causar uma superprodução de ERO, levando à necrose e apoptose.

Níveis de enzimas antioxidantes tornam-se um assunto de interesse por seu possível papel em muitas condições cancerosas é servem como a espinha dorsal do mecanismo de defesa antioxidante celular. Estas enzimas antioxidantes também podem servir como alvos terapêuticos e um guia para o prognóstico em pacientes que sofrem de tal doença.

3.6 DNA Glicosilase OGG1 e OGG2

Ainda que toda a maquinaria celular esteja preparada para a remoção das espécies reativa de oxigênio é possível afirma que em condições de estresse todos os mecanismos não sejam suficientes par a evitar os danos causados por ERO (SCHUMACKER, 2015). Um dos mecanismos mais documentados dos danos oxidativos ao DNA é a oxidação da base guanina, na qual ocorre a incorporação do radical OH^\cdot no carbono 8 da molécula da guanina, formando a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) (KAISA e NISHIMURS, 1983).

Estudos comprovam uma ligação entre a formação de 8-OH-dG e a carcinogênese induzida pelo fumo do tabaco, onde, níveis aumentados de 8-OH-dG foram observados no DNA pulmonar de fumantes com uma correlação observada entre os níveis de 8-OH-dG e o número de cigarros fumados (ASAMI et al., 1997; DAS et al., 2016). Além disso, foram detectados níveis aumentados de 8-OH-dG na mucosa oral dos fumantes em comparação aos não-fumantes. (YARBOROUGH et al., 1996; ROMANO et al., 2000)

A DNA glicosilase 8-oxoG, codificada pelo gene OGG 1 localizado no cromossomo 3p25, é responsável por remover a base oxidada (8-oxoG) no DNA, e dar início ao reparo por excisão da base (BER). A atividade de OGG 1 no DNA excisa preferencialmente a citosina oposta 8-oxoG. Além disso, OGG1 também possui uma atividade de liase AP fraca (NAKABEPPU, 2014).

Existem mais de sete formas de *splicing* alternativo de mRNA OGG1, e estas foram classificadas em dois tipos com base em seus últimos exons. Os tipos 1a e 2a são os principais transcritos de OGG1 em vários tecidos humanos e codificam OGG1-1a e OGG1-2a (NAKABEPPU, 2014). A OGG1-1a tem um sinal de localização nuclear em sua extremidade C-terminal e, portanto, está localizada no núcleo. Já a proteína OGG1-2a, que tem uma região C-terminal única consistindo de duas regiões distintas, uma região ácida e uma região hidrofóbica e está localizada exclusivamente na mitocôndria (NISHIOKA et al., 1999).

O polimorfismo OGG1 está associado ao aumento do risco para vários tipos de câncer, estudos verificaram que o polimorfismo Ser326Cys aumenta o risco de câncer de cabeça e pescoço e câncer colorretal (KUMAR et al. 2011; CANBAY et al. 2011), em associação com hábitos etiológicos como o tabagismo (ELAHI et al. 2002).

David et al. (2007), afirmam que se a lesão não é removida corretamente do DNA, podem ocorrer mutações do tipo transversão G:C para T:A. Além disso, Foti e colaboradores (2012), afirmam que quando ocorre a formação de muitas lesões 8-oxoG no DNA e as mesmas encontram-se muito próximas uma das outras, a capacidade de reparo da célula pode não ser suficiente acarretando na morte da célula.

O reparo de excisão por base de DNA (BER) é a principal via para reparo de lesões oxidadas (MITRA et al., 2001). A remoção da base lesionada é o primeiro passo na BER, e é realizada por glicosilase de DNA, que produz extremidades de fosfato de 3'-hidroxila ou 5'-desoxirribose que posteriormente são reconhecidas por uma endonuclease denominada apurínica/apirimidínica/fator redox 1 (APE-1/Ref-1) (D'ERRICO et al., 2008).

3.7 Endonuclease apurínica/apirimidínica/fator redox (APE-1/Ref-1)

A APE-1, endonuclease apurínica/apirimidínica 1 e também conhecida como fator efector redox (Ref-1) é uma proteína que exerce duas funções, a atividade redox e a de reparo por excisão de base (BER), determinadas em regiões completamente independentes. A região N-terminal desempenha principalmente a atividade de co-ativação transcricional mediada pela ação da redução, já a região C-terminal exerce a função enzimática em sítios abásicos no DNA, principalmente através de resíduos H309 em seu sítio catalítico (XANTHOUDAKIS et al., 1994).

Fleck e Nielsen (2004), afirmam que na via BER a proteína é responsável pelo reparo de danos oxidativos e de alquilação, favorecendo a proteção contra efeitos tóxicos de agentes endógenos e exógenos, isso inclui também os quimioterápicos.

A distribuição da APE1/REF-1 nos diferentes tipos celulares de mamíferos é principalmente nuclear e é crítica para o controle da taxa de proliferação da célula, a expressão citoplasmática tem sido correlacionada com agressividade de diferentes tumores (IZUMI et al., 2005; JACKSON et al., 2005 SMITH et al., 2008).

Como já relatado a exposição da célula ao estresse oxidativo causa vários danos celulares, incluindo danos ao DNA (SCHUMACKER, 2015). As lesões causadas ao DNA são geralmente reparadas através da via BER, via também responsável pelo reparo de lesões de fitas simples, causadas por agentes metilantes e de um grande número de depuração espontâneas. Enzimas envolvidas nesse sistema de reparo reconhecem as lesões e catalisam a excisão e substituição do nucleotídeo modificado (DAVID et al., 2007; EVANS et al., 2004).

O BER possui duas subvias de reparo de bases, a via curta (do inglês: *single nucleotide- SP- BER*) e via longa (*long patch – LP-BER*) responsáveis pela remoção de um ou de 2 a 7 nucleotídeos respectivamente. Após a lesão no DNA as etapas dessa via ocorrem da seguinte forma: 1) uma glicolase específica realiza a excisão da base com lesão, 2) incisão dos sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP), 3) processamento das extremidades bloqueadas, 4) preenchimento da lacuna formada e, 5) ligação da nova fita sintetizada (LIU e WILSO, 2012).

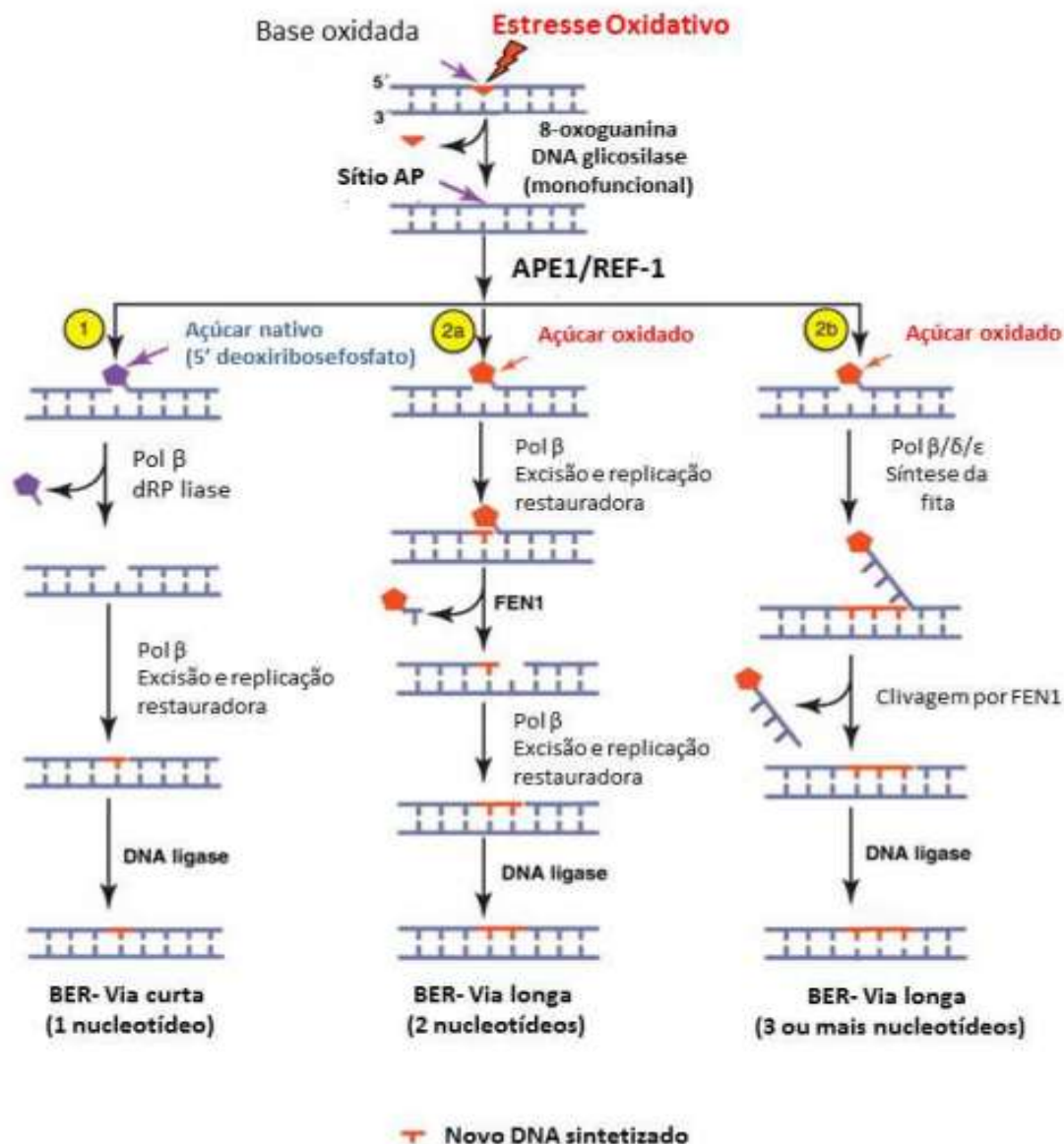


Figura 2- Uma representação esquemática do reparo de bases oxidadas no DNA pela via BER. O estresse oxidativo pode resultar em lesões de bases oxidadas no DNA, como por exemplo, formação de 8-oxoguanina (8-oxoG). A DNA glicosilase OGG1 é capaz de remover a lesão do tipo 8-oxoG deixando um sítio AP. Em seguida, APE1/REF-1 promove a incisão na região 5' do esqueleto açúcar-fosfato no sítio AP, deixando um agrupamento nativo não

oxidado 5-fosfatodesoxirribose (dRP) ou um grupo 3'-OH próximo ao espaço do nucleotídeo. A ponte com um grupo não oxidado é reparado pela sub via SN-BER (1), ao passo que a extremidade com o açúcar oxidado pode se reparado pelo sub via LP-BER (2a e 2b). (1) Os próximos passos da via curta são a adição de um nucleotídeo na lacuna gerada e remoção do agrupamento 5'-dRP pela DNA polimerase β ($pol\beta$). Subsequentemente, a $pol\beta$ promove o preenchimento da lacuna deixando um intermediário de DNA livre para ligação. Neste cenário, o reparo envolve uma substituição de apenas um nucleotídeo por isso é a via SN-BER. (2) Para o cenário onde o açúcar oxidado é resistente a atividade de dRP liase da $pol\beta$ o reparo desses intermediários bloqueados pode seguir pela via longa BER, a qual envolve a resíntese de um oligonucleotídeos de comprimento. A síntese de DNA nesta via é realizada por diversas polimerases e requer fatores de replicação e o produto final do DNA reparado é selado por uma ligase. Dependente da quantidade de substituição de nucleotídeos necessários que é recrutado o aparato enzimático específico. (Adaptado de Liu e Wilson, 2012).

Nos mamíferos a principal AP- endonuclease é a APE1/REF-1, que se liga de forma rígida ao DNA, favorecendo a estabilidade e a conformação necessárias para formar os sítios AP, que a partir do momento que são gerados se não forem adequadamente processados podem levar a quebra da fita de DNA, apoptose e aumento da citotoxicidade (GORMAN et al, 1997; LOEB e PRESTON, 1986). Mediante a esse contexto a APE1/REF-1 é uma enzima indispensável na manutenção da via BER e deficiências nessa via estão sendo associadas a diversos tipos de cânceres e doença neurodegenerativas (PARSONS e DIANOV, 2013).

A função redox da APE1/REF-1 é responsável por regular a expressão gênica, sabe-se que é capaz de regular a ligação de fatores de transcrição no DNA de proteínas tais com, AP-1, NF- κ B, EGR-1, através do controle do estado redox dos resíduos Cys localizados nos domínio de ligação ao DNA ou em regiões reguladoras do fator de transcrição (TELL et al., 2010; XANTHOUDAKIS et al., 1994) .

Altos níveis de espécies reativas de oxigênio ativam a expressão da proteína em resposta ao estresse oxidativo, aumentando sua atividade de endonuclease (TELL et al., 2010). Interações moleculares proteína-proteína tem um papel importante tanto na função de reparo quanto de redox de APE1/REF-1 e são essenciais para o entendimento de varias doenças humanas (BENNETT et al., 1997). Além disso, para sua funcionalidade no meio celular proteína da interação específica com a TRX (QIN et al., 1996).

3.8 Sistema da tiorredoxina

A tiorredoxina (Trx) são proteínas óxido-redutases de cerca de 12 kDa, estão envolvidas em diversos processos celulares, tais como, defesa contra estresse oxidativo, proliferação e viabilidade celular, geralmente envolvendo trocas tióis-dissulfeto (ARNÉR; HOLMGREN, 2006; HOLMGREN; LU, 2010; LU; HOLMGREN, 2014). Holmgren e Björnstedt (1995) relatam que a Trx possui um sítio dissulfeto/ditiol redox-ativo em sua estrutura e que opera conjuntamente com a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e a enzima tiorredoxina redutase (TrxR) (Figura 3), formando um sistema redutor eficiente que, em cooperação com peroxidases Trx-dependentes, promove a remoção do H₂O₂ intracelular.

Estruturalmente a proteína Trx apresenta um domínio característico, o “domínio tiorredoxina”, que é composto de uma sequência de 4 aminoácidos (-Cys-Gly-Pro-Cys-), contendo duas cisteínas estruturalmente próximas em seu sítio ativo. Existem pelo menos três tipos de Trx em mamíferos: a Trx1 é expressa no citosol, a Trx2 na mitocondrial e a spTrx é expressa nos espermatozoides (LU; HOLMGREN, 2014). Arner e Holmgren (2000) afirmam que com isoformas diversas as tiorredoxinas são encontradas em diferentes espécies em abundância, e participam de reações biossintéticas essenciais e da regulação de muitas funções biológicas.

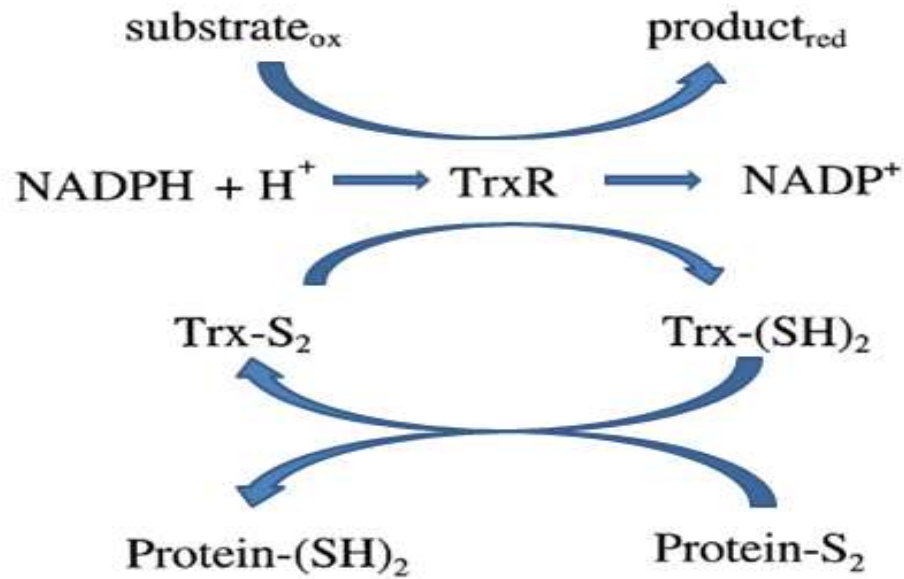


Figura 3: O Esquema das atividades da oxidorreductase do sistema tiorredoxina. A figura mostra esquematicamente a redução da tiorredoxina oxidada no local ativo, Trx-S_2 , a um ditiol na tiorredoxina reduzida, Trx-(SH)_2 , pela tiorredoxina redutase (TrxR) e NADPH . Trx-(SH)_2 reduz os sulfuretos de proteína pela sua atividade geral de oxidorreductase, gerando Trx-S_2 . Adaptado (Arnér e Holmgren, 2000).

Os componentes do sistema da Trx não participam apenas da remoção de ROS do ambiente celular, como podem desempenhar papéis regulatórios em diversas funções celulares pela interação proteína-proteína (MASUTANI et al., 2005). A Trx pode regular a atividade de proteínas redox-sensíveis, envolvidas na transdução de sinais e expressão gênica, como a proteína ativadora 1, o fator nuclear κB ($\text{NF}\kappa\text{B}$), e a cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1) (HIROTA et al., 1997; SAITOH et al., 1998).

A proteína APE-1/Ref-1 é uma das proteínas modificadas pós-traducionalmente por fosforilação e modificação redox através da enzima Trx (Evans et al., 2000). A interação de Ape1 / Ref-1 e Trx, funcionalmente é observada no aumento da ligação específica de seqüência de DNA de AP-1 e p53 (HIROTA et al., 1997; UENO et al., 1999).

3.9 Fatores prognósticos

O “Sistema TNM para Classificação de Tumores Malignos” foi desenvolvido com a finalidade de padronização de tumores, o qual, ainda hoje, é o sistema de estadiamento clínico mais utilizado (SOBIN et al., 2009; Almeida et al., 2011; DISSANAYAKA et al., 2012). O sistema baseia-se na extensão do tumor primário (T), na ausência ou presença e extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e na ausência ou presença de metástase à distância (M) (MOURA et al., 2016). O estadiamento da doença é obtido após a classificação do tumor conforme o TNM e para plano de tratamento destes doentes é importante combinar os achados de diagnóstico clínico e estadiamento, com o histopatológico da lesão (MOURA et al., 2016).

Em relação ao paciente o protocolo terapêutico é definido de acordo com a classificação do estadiamento. A ocorrência de metástase tumoral ou recidiva, mesmo combinadas com o tratamento, são consideradas os principais fatores para um pior prognóstico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Entender a rápida evolução da biologia do câncer e a descoberta e validação de fatores biológicos que predizem os resultados em resposta ao tratamento com maior precisão levaram alguns especialistas em câncer a questionar a unicidade de uma abordagem baseada no Sistema Internacional de classificação dos tumores (TNM) favorecendo um cuidado clínico a nível mais individualizado do paciente (AMIN et al., 2017).

É definido como um marcador prognóstico qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações a respeito da sua evolução clínica. O marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. É considerado preditivo quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica (SHMITT et al. 1998).

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 os fatores prognósticos principais para determinar a conduta terapêutica estão baseados na 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). Contudo, estes indicadores às vezes não são capazes de prever as elevadas variações na resposta ao tratamento e prognóstico.

O carcinoma oral de células escamosas desenvolve-se a partir de uma lesão pré-maligna existente, tais como leucoplasia, eritroplasia ou leucoplasia verrucosa proliferativa. Mediante a esse fato Slaughter et al. (1953), propuseram o conceito de “cancerização de campo” , que se refere a formação de grandes campos pré-neoplásicos de epitélio mucoso exposto a carcinógenos que não são aparentes no exame clínico ou histológico, ocorrendo a nível molecular. Gerando uma conseqüência a nível celular, na qual as células adquirem e acumulam umas séries de alterações genéticas ou epigenéticas levando a uma desregulação do ciclo celular e a proliferação celular descontrolada predispondo a transformações malignas (FELLER et al., 2013).

Esse conceito de campos pré-cancerizados no carcinoma oral de células escamosas foi caracterizado com base na expressão de um supressor de tumor mutado, o p53, inicialmente células com mutação de perda da função do gene TP53, adquirem mutações adicionais, permitindo vantagens em relação à proliferação celular e, eventualmente, formando um campo pré-neoplásico (BRAAKHUIS et al., 2003; van HOUTEN et al, 2002).

Estão descritas várias características prognósticas relacionadas ao tumor e o paciente, entretanto existe pouca informação disponível de como superar os riscos e direcionar a modalidade terapêutica. A heterogeneidade tumoral é um grande desafio e a causa fundamental dos piores desfechos, agressividade e principalmente da resistência ao tratamento. Tem sido uma alternativa a utilização de marcadores biológicos, uma vez que, são capazes de auxiliar na identificação dos processos de progressão tumoral, prognóstico, avaliação da resposta ao tratamento e até mesmo

determinar o comportamento biológico tumoral e características relacionadas a agressividade tumoral.

Dentro desse contexto, as proteínas da via de estresse oxidativo SOD-1, APE1 / REF-1, OGG1 e tioredoxina (TRX), que foram inicialmente caracterizadas em células MCF-7 (células de câncer de mama), formam uma rede interligada de proteínas que ajudam a manter funcionalmente o ambiente intracelular e tornam-se potenciais para estudos de microambiente tumoral (CURTIS et al., 2010). A SOD-1 converte superóxido em peróxido de hidrogênio desempenhando assim, um papel essencial na regulação intracelular de EROS, limitando proteínas e os danos do DNA. A TRX reduz e ativa APE1/ REF-1 age no sítio de DNA que sofreu excisão através da OGG1, juntos APE1 / REF-1, TRX ajudam a reverter a oxidação induzida por EROS de numerosos fatores de transcrição e outras proteínas celulares (CURTIS et al., 2010) (Figura 3).

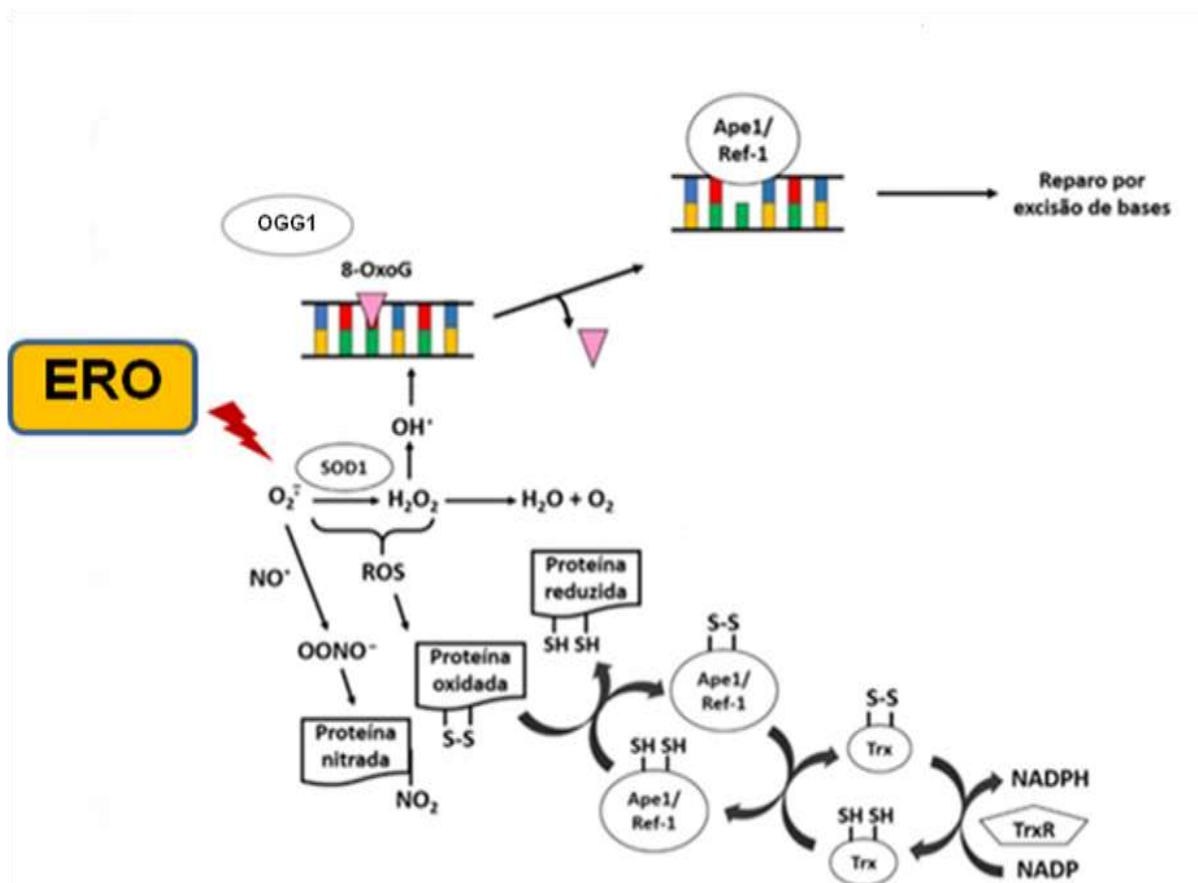


Figura 4- Papel do estresse oxidativo e proteínas de reparo do DNA nas células (modificado de CURTIS et al., 2010).

O estudo dessa via em tecido de câncer de mama demonstrou que a expressão das proteínas SOD 1, APE1 / REF-1, a TRX é elevada, assim, parece plausível que a expressão aumentada da SOD1 possa ajudar a reduzir o acúmulo de EROS e promover a sobrevivência das células cancerígenas por meio da ativação da expressão de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) mediada por *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF1) (GRZENKOWICZ-WYDRA et al., 2004; JUAREZ et al., 2006).

De acordo com Kim et al. (2013), 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.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: **American Cancer Society**; 2009.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin system in câncer. **Semin Cancer Biol**, Dec; 16(6):420-6, 2006.
- ARNÉR, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur. J Biochem**. 267: 6102-6109, 2000.
- ASAMI,S. et al. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8 hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. **Carcinogenesis** , 18 , 1763 –1766, 1997.
- BANDEIRA, Celso Muller. et al. Tobacco influence in heavy metals levels in head and neck cancer cases. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 27, p. 27650-27656, 2018.
- BÁNFALVI G. Heavy metals, trace elements and their cellular effects. In: Bánfalvi G, editor. Cellular Effects of Heavy Metals. New York: **Springer**, pp. 3–28, 2011.
- BIRBEN E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, Jan;5(1):9-19, 2012.
- CANBAY E. Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Turkish population. **Curr Med Res Opin**, 27(7):1295–1302, 2011.
- CESAREO R. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. **Nuclear analytical techniques in medicine**, vol.8. New York: Ed. Elsevier; 1988.

- CHEN, F. et al. Carcinogenic metals and NF-kappa B activation. **Mol. Cell. Biochem**, 222, pp. 159-171, 2001.
- CONDOLUCI, A.; MAZZARA, C.; ZOCCOLI, A.; PEZZUTO, A.; TONINI, G. Impact of smoking on lung cancer treatment effectiveness: a review. **Future Oncol**, 12:2149–2161, 2016.
- CONWAY, D. I.; PURKAYASTHA, M.; CHESTNUTT, I. G. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. **Br Dent J**, 225: 867-873, 2018.
- DAS, S. et al. Association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of upper aero-digestive tract and gastrointestinal cancers: A meta-analysis. **Springerplus**, 5, p. 227, 2016.
- DAVID, S.S.; O'SHEA, V.L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, 447: 941–50, 2007.
- D'ERRICO, M.; PARLANTI, E.; DOGLIOTTI, E . Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. **Mutat Res**, Jul-Aug; 659(1-2):4-14, 2008.
- DISSANAYAKA, W. L. et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral 40 squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 113(4): 518–525, 2012.
- DU X. et al. Penetration of N-nitrosomonicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **Oral Pathol Med**, Feb; 29(2):80-5, 2000.
- ELAHI, A. et al. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. **Carcinogenesis** 23(7):1229–1234, 2002.
- ELAHI, Abul. et al. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 7, p. 1229-1234, 2002..
- EVANS, A. R, LIMP-FOSTER M, KELLEY MR. Going APE over ref-1. **Mutat. Res.**461:83–108, 2000.
- EVANS, Angela R.; LIMP-FOSTER, Melissa; KELLEY, Mark R. Going APE over ref-1. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 461, n. 2, p. 83-108, 2000.
- FOTI, J. J. et al. Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. **Science** 336: 315–319, 2012.
- HIROTA, K. et al. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 94:3633-3638, 1997.
- HIROTA, K. et al. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 94, pp. 3633-3638, 1997.
- HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol.** 252:199-208, 1995.

HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 120–124, 2010.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Alcohol drinking. IARC Sci Publ No. 44. Lyon: IARC. 1988.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans. Vol. 83: Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: IARC Press. 2004

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **Nucleic Acids Symp Ser**, p. 165-7, 1983.

Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **J Cancer Res Ther**, 12:458-63, 2016.

Kumar, A. Role of OGG1 Ser326Cys polymorphism and 8-oxoguanine DNA damage in risk assessment of squamous cell carcinoma of head and neck in North Indian population. **Mutat Res**, 726(2):227–233, 2011.

LINCOLN, David T. et al. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. **Anticancer research**, v. 23, n. 3B, p. 2425-2433, 2003.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75–87, 2014.

MATÉS, José M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Francisca M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 32, n. 2, p. 157-170, 2000.

Mitra S, Boldogh I, Izumi T, Hazra TK. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. **Environ Mol Mutagen**, 38(2-3):180-90, 2001.

MOURA, L. B. et al., Estadiamento TNM para o tratamento de câncer bucal. **Rev. Odontologia (ATO)**, Bauru, SP., v. 16, n. 3, p. 100-108, mar, 2016.

NAKABEPPU, Yusaku. “Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells.” **International journal of molecular sciences**, vol. 15,7 12543-57. 15 Jul. 2014.

NISHIOKA, K. et al. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. **Mol Biol Cell**, May; 10(5):1637-52, 1999.

OBERLEY, Larry W.; BUETTNER, Garry R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. **Cancer research**, v. 39, n. 4, p. 1141-1149, 1979.

QIN, J.; CLORE, G. M.; KENNEDY, W. P.; KUSZEWSKI, J.; GRONENBORN, A. M. The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. **Structure**, May; 4 (5) : 613–20, 1996.

- REUTER, Simone et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- ROMANO, G. et al. Evaluation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human oral cells: the importance of tobacco smoke and urban environment. **Anticancer Res**, 20, 3804 – 3806, 2000.
- SAITOH, M. et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signalregulating kinase (ASK) 1. **EMBO J**, 17:2596-2606, 1998.
- SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil. **Cancer cell**, v. 27, n. 2, p. 156-157, 2015.
- SCHWARTZ, M. K. Role of Trace-Elements in Cancer. *Cancer Research*, 35(11): 3481-3487, 1975.
- SHAH, Jatin P.; GIL, Ziv. Current concepts in management of oral cancer–surgery. **Oral oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 394-401, 2009.
- SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
- SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report. IARC Press. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2014.
- TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. **EXS**, 101:133–64, 2012.
- TELL, G.; FANTINI, D.; QUADRIFOGLIO, F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. **Cell Mol Life Sci**. 67(21):3589–608, 2010.
- UENO, M. et al. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi, T. Nikaido Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation **J. Biol. Chem.**, 274, pp. 35809-35815, 1999.
- VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, 12, pp. 1161-1208, 2005.
- WOOTEN, J. B.; CHOUCANE, S.; MCGRATH, T. Tobacco smoke constituents affecting oxidative stress. **Cigarette Smoke and Oxidative Stress**, Springer, p. 407, 2006.
- XANTHOUDAKIS, S.; MIAO, G. G.; CURRAN, T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 91(1):23–7, 1994.
- YARBOROUGH, A. et al. Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxine B1-treated rat liver and human oral mucosal cells. **Cancer Res.**, 56, 683 –688, 1996.

**CAPÍTULO 1: INTERELAÇÕES PROTÉICAS,
ELEMENTARES E ESTILO DE VIDA EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMOIDE ORAL**

Artigo a ser submetido.

INTERELAÇÕES PROTEICAS, ELEMENTARES E ESTILO DE VIDA EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Resumo

O uso do tabaco é o principal fator etiológico para câncer oral, sendo conhecido por gerar radicais livres, capazes de causar estresse oxidativo. Os componentes do cigarro, incluindo metais e metalóides são os principais geradores de espécies reativas e suas concentrações excedentes podem atuar no processo e carcinogênese. A célula possui um sistema de defesa antioxidante que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas, e, caso esse dano seja gerado é necessário um mecanismo de reparo celular. Nesse contexto, a proposta buscou estudar as interações proteína-proteína das vias de estresse oxidativo (SOD-1 e Trx) e reparo de DNA (OGG1/2 e Ref-1), bem como avaliar suas associações com hábitos de vida e a presença de elementos químicos nos tecidos tumorais. Para tanto, foi realizada a análise da expressão das proteínas por imunohistoquímica e caracterização elementar por μ -XRF de tumores de cavidade oral. Os resultados mostraram que o hábito tabagista foi associado com o aumento da expressão de SOD-1, OGG1/2 e Trx. O elemento cromo esteve associado com o aumento da expressão de Ref-1 e Trx, o níquel com diminuição da expressão da proteína Ref-1 e o elemento magnésio com diminuição de OGG 1/2. Foi possível observar também uma forte interação proteína-proteína de OGG 1/2 com SOD-1. Os dados levam a uma melhor compreensão dos elementos químicos absorvidos através do hábito tabagista, na modulação da expressão das proteínas da via de estresse oxidativo e reparo de DNA. Os dados levam a uma melhor compreensão de como os elementos químicos, absorvidos através do hábito tabagista, modulam a expressão das proteínas da via de estresse oxidativo e reparo de DNA.

Palavras-chave: Enzimas; estresse oxidativo; reparo, tabaco; câncer oral.

INTRODUÇÃO

Na promoção da carcinogênese, o tabaco pode atuar como um agente mutagênico e iniciador das vias de proliferação celular, além disso, as substâncias carcinogênicas da sua composição podem aumentar a modificação do DNA pela oxidação, bem como por desregulação do metabolismo celular, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MOFFATT et al. 1991; PRYOR et al. 1993).

O impacto do aumento na produção das ERO na carcinogênese, relaciona-se à instabilidade genômica e a promoção de danos do DNA que contribuem para transformação maligna celular (SARDARO et al., 2019), bem como na promoção da metástase e invasão celular (QIN et al., 2017).

Somado a este, os elementos traços presentes na composição do cigarro, também representam importantes fatores de risco quando em concentrações alteradas no interior celular, uma vez que podem induzir alterações biológicas, nos mecanismos mediadores da regulação celular (MAJEWSKA et al., 1997; TALHOUT et al., 2011).

Para evitar os danos celulares induzidos pela ERO, um sistema antioxidante é ativado (SARDARO et al., 2019). Nesse sentido, as proteínas superóxido dismutase (SOD) catalisam a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), quando não decomposto em água o H_2O_2 é responsável por gerar o radical hidroxila (OH^\cdot), que oxida a base guanina na posição C8 resultando na formação de 8-hidroxidesoxiguanosina (OH8dG) que é extremamente danoso ao DNA (VALKO et al., 2006; CHEN et al., 2007). Quando esse dano é gerado, a enzima 8-oxoguanine

glycosylase (OGG 1) é responsável por remover a base modificada gerando sítios apurínicos apumidinicos (AP) (DAVID et al., 2007).

Em seguida a enzima Ape1 / Ref-1 entra em ação e promove a incisão na região 5' do esqueleto açúcar-fosfato do sítio AP, deixando um agrupamento nativo não oxidado 5'-fosfatodesoxirribose (dRP) ou um grupo 3'-OH próximo ao espaço do nucleotídeo, dando prosseguimento a reparação (WHITAKER et al. 2017). No entanto, para a Ape1 / Ref-1 se tornar funcional é necessário que a proteína Tiorredoxinas (Trx), reduza e ative a Ape1 / Ref-1, sendo assim, as interações entre as proteínas ajudam a reverter à oxidação induzida por ERO (CURTIS et al., 2010).

O entendimento sobre a modulação redox do estresse oxidativo e reparo de DNA, contribuem para elucidação dos mecanismos de desenvolvimento e progressão de tumores malignos (POPRAC et al., 2017; RANI et al., et al., 2016; KATAKWAR et al., 2016), sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão, SOD-1, Trx, Ape1 / Ref-1 e OGG1/2 que compõem o sistema antioxidante e de reparo, bem como entender possíveis mecanismos de atuação dos elementos traços como potencial regulatório dessas proteínas em pacientes com câncer oral.

Material e métodos

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.

Casuística e amostras

Neste estudo, foram obtidas 78 amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma epidermoide 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. Os casos têm confirmação histológica através de 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.

Entre os indivíduos analisados, a idade média foi de $63,69 \pm 11,01$ anos, sendo 54 (69,23%) homens e 24 (30,77%) mulheres (Tabela 1). Sobre o estilo de vida, é possível observar que 52,56% são tabagistas e 43,59% consomem algum tipo de bebida alcoólica. Quando categorizada em histórico de consumo de tabaco foi possível perceber que, 82,06% dos pacientes já consumiram ou consomem tabaco, e em relação ao consumo atual de tabaco 52,57 ainda possuem o hábito tabagista.

Tabela 1: Características epidemiológicas dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral.

Características	Total	
	N.	(%)
Gênero		
Feminino	24	30,77
Masculino	54	69,23
Idade, anos		
Média		63,69
Desvio padrão		±11,01
Mediana		63
Tabagismo		
Nunca	14	17,95
Sim, no passado	23	29,49
Sim, atualmente	41	52,56
Já consumiu tabaco		
Não (Nunca)	14	17,94
Sim (Parou + Atual)	64	82,06
Consumo atual de tabaco		
Não (Nunca +Parou)	37	47,43
Sim (Atual)	41	52,57
Consumo de bebidas alcoólicas		
Nunca	17	21,79
Sim, no passado	27	34,62
Sim, atualmente	34	43,59
Já consumiu bebida alcoólica		
Não (Nunca)	17	21,8
Sim (Parou + Atual)	61	78,2
Consumo atual de bebida alcoólica		
Não (Nunca +Parou)	44	56,4
Sim (Atual)	34	43,6
Total	78	100,00

*Classificação TNM (7ª edição); §Não entrou nos cálculos estatísticos

Tissue microarrays

Os *tissue microarrays* (TMA) foram confeccionados como descrito anteriormente em Cajaiba e colaboradores (2006), a partir de 78 amostras de carcinomas epidermóides primários de cavidade oral. As seleções das duas áreas tumorais foram realizadas, por dois patologistas através da análise de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Dois cilindros de 1,5 mm de diâmetro foram perfurados de cada amostra do bloco doador e reintroduzidos em blocos de parafina

receptores usando um *tissue microarrayer* (BeecherInstruments®, Silver Spring, MD, EUA).

Caracterização elementar

Para a caracterização elementar as amostras, com espessura média de 450 μm e densidade de 0,54 g/cm^3 , foram dispostas em suporte com filme de Ultralene® na linha de luz D09-XRF. Para aquisição dos espectros, um feixe branco com faixa de energia de 4 a 24 keV e dimensões de 2 mm^2 incidia nas amostras durante 20 segundos e excitava os elétrons. Os raios X fluorescentes emitidos foram detectados por meio de um espectrômetro de alta resolução, baseado em um detector *Silicon Drift* com janela de berílio de 8 μm de espessura e área ativa de 7 mm^2 . No feixe foi utilizado um filtro de alumínio de 45 μm e o suporte contendo a amostra foi posicionado a uma distância de 21mm e ângulo de 45° em relação ao detector. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente e pressão normal.

Nove medidas em uma matriz de 3x3 foram realizadas e posteriormente uma média das medidas para a obtenção do espectro final utilizado nas análises. Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos e a determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes, foi realizada uma análise de uma amostra de referência certificada, a *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 foi a base para as análises (SOLÉ et al., 2007).

As medidas de μ 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 imunohistoquímica

As lâminas de TMA foram submetidas à reação de imuno-histoquímica na qual foi utilizado o Kit da Spring Bioscience® (Califórnia, Estados Unidos, PMB1-250). O anticorpo anti-SOD-1, diluição 1:400 (SC-11407, Santa Cruz), anticorpo anti-Ref-1, diluição 1:400 (SC-17774, Santa Cruz), anticorpo anti-OGG1/2, diluição 1:100 (SC-376935, Santa Cruz) e anti-Trx, diluição 1:100 (SC-166393, Santa Cruz) foram utilizados na reação. Controles negativos (ausência de anticorpo primário) foram usados para padronizar as reações. A expressão das proteínas nos tecidos foi analisada, independentemente, por dois analisadores avaliadores.

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), segundo a metodologia utilizada por trabalhos que fizeram análises

semelhantes ao presente estudo (SOINI et al., 2000; CAMPOS et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Análise Estatística

Para os testes de associação foram utilizados o teste Qui-quadrado em análise bivariada e, quando necessário, o teste exato de Fisher, com margem de erro de 5% e com correção de Bonferroni. A regressão logística multivariada por modelagem foi utilizada para ajustar os valores do *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança (IC 95%). As variáveis predictoras que obtiveram valor p inferior a 20% ($p < 0,20$) foram inseridas pelo método *backward* no modelo multivariado de Regressão logística, permanecendo no modelo final, a cada etapa, as variáveis significativas ($p < 0,05$). Os cálculos matemáticos foram realizados com a utilização do programa IBM SPSS STATISTICS® v. 20, 2011.

Resultados

Caracterização elementar

A análise de caracterização elementar revelou a presença de magnésio em 11.54% da amostra, de fósforo em 93.59%, de enxofre em 98.72%, de cloro em 35.90%, de potássio em 82.72%, de cálcio em 98.72%, de cromo em 42.31%, de manganês em 33.33%, de ferro em 100.00%, de zinco em 100.00%, de cobalto em 11.54%, de níquel em 14.10%, de cobre em 94.87% e de arsênio e bromo em 67.95% da amostra analisada (Tabela 1).

Tabela 2: Caracterização elementar das amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral.

Elemento	Total	
	N.	(%)
Magnésio		
Ausente	69	88.46
Presente	9	11.54
Fósforo		
Ausente	5	6.41
Presente	73	9.59
Enxofre		
Ausente	1	1.28
Presente	77	98.72
Cloro		
Ausente	50	64.10
Presente	28	35.90
Potássio		
Ausente	14	17.95
Presente	64	82.05
Cálcio		
Ausente	1	1.28
Presente	77	98.72
Cromo		
Ausente	45	57.69
Presente	33	42.31
Manganês		
Ausente	52	66.67
Presente	26	33.33
Ferro		
Ausente	0	0.00
Presente	78	100.00
Cobalto		
Ausente	69	88.46
Presente	9	11.54
Níquel		
Ausente	67	85.90
Presente	11	14.10
Cobre		
Ausente	4	5.13
Presente	74	94.87
Zinco		
Ausente	0	0.00
Presente	78	100.00
Arsênio		
Ausente	25	32.05
Presente	53	67.95
Bromo		
Ausente	25	32.05
Presente	53	67.95
Total	78	100.00

Análises das expressões das proteínas

A análise da expressão das proteínas foi realizada de acordo com dois parâmetros, isto é, análise da expressão nuclear e citoplasmática. As proteínas SOD-1, Trx, OGG 1/2 e Ref-1 apresentaram padrão de expressão positivo tanto para núcleo quanto para citoplasma em todas as amostras, sendo observada a diferença no padrão de intensidade de expressão entre o citoplasma e o núcleo (Figura 1).

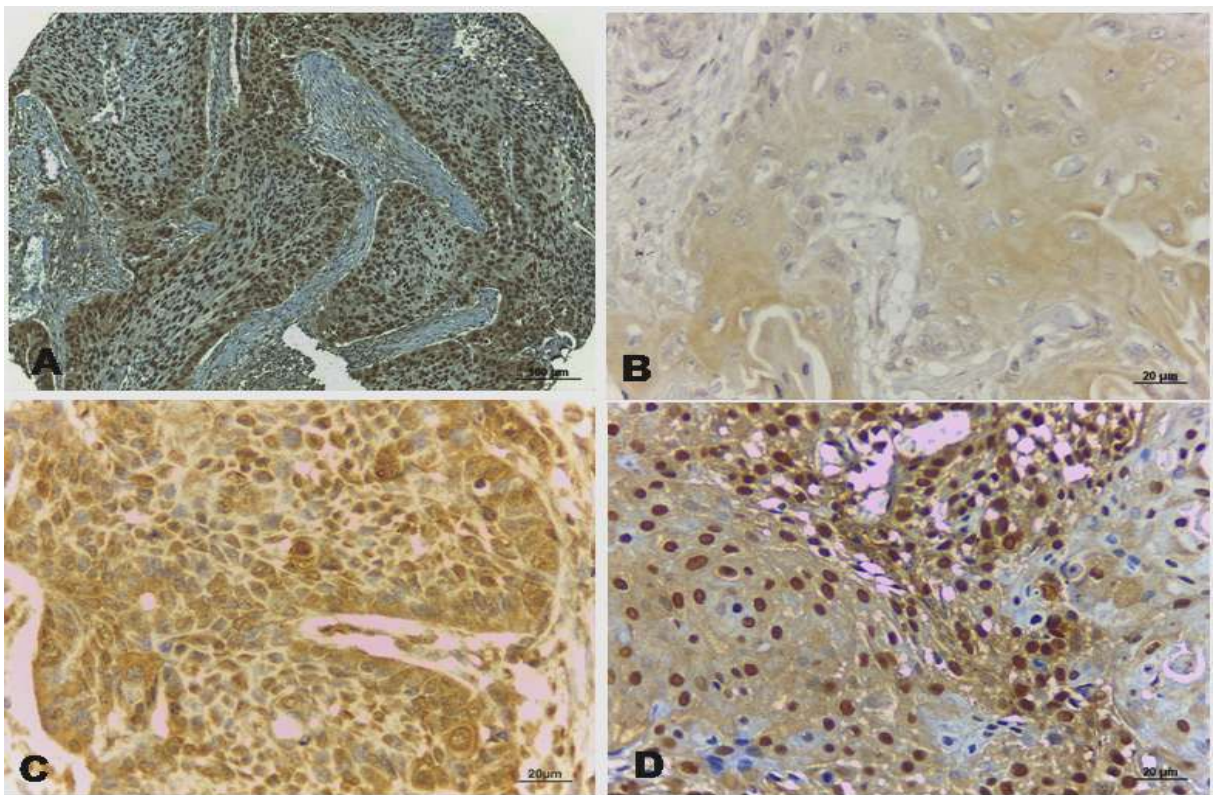


Figura. 1 Imunomarcção de um *spot*, onde é possível observar a intensidade de marcação forte nos núcleos e intensidade fraca de marcação no citoplasma da proteína Ref-1 (A). Imunomarcção citoplasmática de intensidade fraca SOD-1 (B). Imunomarcção citoplasmática e nuclear de intensidade forte da proteína Trx (C). Imunomarcção nuclear forte da proteína OGG1/2 em carcinoma epidermóide de cavidade oral (D). Magnificações originais de 100x (A) e 400x (B, C e D).

Padrão de expressão das proteínas *versus* estilo de vida e a presença de elementos

Os resultados apontam que o histórico de consumo de tabaco aumenta em 6 vezes a expressão citoplasmática forte da proteína SOD-1 (OR= 6.29; IC=1.430-27.680). Além do hábito tabagista, foi avaliada a associação entre a expressão das proteínas entre elas, desta forma, a expressão forte de SOD-1 é influenciada pela expressão citoplasmática forte da proteína OGG1/2, com um aumento de 14 vezes (OR= 14.40; IC=1.479-140. 185), e a expressão nuclear forte da proteína Trx, atua na redução da expressão forte de SOD-1 no citoplasma em aproximadamente 7 vezes (OR= 0.132; IC= 0.030-0.579) (Tabela 2).

Tabela 3: Análise multivariada da expressão da proteína SOD-1 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.

Característica	Análise multivariada			
	SOD-1 citoplasmática forte		SOD-1 nuclear forte	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Histórico do consumo de Tabaco				
Não	1			
Sim	6.29 (1.430-27.680)	0.015		
OGG1/2 citoplasmática				
Fraca	1			
Forte	14.40 (1.479-140.185)	0.022		
Trx nuclear				
Fraca	1			
Forte	0.132(0.030-0.579)	0.007		
SOD-1 citoplasmática				
Fraca			1	
Forte			3.406(0.945-12.282)	0.061
Ref-1 nuclear				
Fraca			1	
Forte			3.642(0.928-14.299)	0.064

A avaliação dos metais em relação à expressão nuclear forte de Ref-1, demonstrou que a presença do elemento cromo aumenta em 13 vezes a expressão forte da proteína (OR= 13.320; IC= 1.270-139.688). Já a presença do elemento níquel, atua reduzindo em 20 vezes a expressão nuclear forte de Ref-1 (OR= 0.048; IC=0.004-0.533). A expressão citoplasmática forte de Ref-1 atua aumentando em 16 vezes a expressão nuclear forte de Ref-1 (OR= 16.053; IC=1.086-237.200). (Tabela 3).

A expressão nuclear forte da proteína OGG 1/2 diminui em aproximadamente 22 vezes na presença do elemento magnésio (OR= 0.044; IC=0.004-0.498). Além disso, a sua expressão forte no citoplasma aumenta em 9 vezes a expressão forte nuclear (OR= 9.043; IC=2.577-31.730). (Tabela 4).

O consumo de tabaco aumenta em aproximadamente 3 vezes a expressão citoplasmática forte da proteína OGG1/2 (OR= 3.765; IC=1.179-12.021), e a expressão forte da proteína SOD-1 também favorece a expressão citoplasmática forte de OGG1/2 em aproximadamente 10 vezes (OR= 10.377; IC=1.151-93.590). A interação entre os locais de expressão foi observada, na qual foi possível observar a expressão nuclear de OGG1/2 no aumento em mais de 5 vezes da expressão forte da proteína no citoplasma (OR= 5.733; IC=1.829-17.971) (Tabela 4).

Tabela 4: Análise multivariada da expressão da proteína Ref-1 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.

Característica	Análise multivariada			
	Ref-1 nuclear forte		Ref-1 citoplasmática forte	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Elemento Cromo				
Ausente	1			
Presente	13.320 (1. 270-139.688)	0.031		
Elemento Niquel				
Ausente	1			
Presente	0.048 (0.004-0.533)	0.014		
Ref-1 citoplasmática				
Fraca	1			
Forte	16.053(1,086-237.200)	0.043		
SOD-1 citoplasmática				
Fraca			1	
Forte			2.484(0.629-9.810)	0.194
Elemento Arsênio				
Ausente			1	
Presente			2.375(0.758-7.437)	0.138

Tabela 5: Análise multivariada da expressão da proteína OGG1/2 em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.

Característica	Análise multivariada			
	OGG1/2 nuclear forte		OGG 1/2 citoplasmática forte	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Histórico de consumo de álcool				
Sim	1			
Não	4.288(0.945-19.451)	0.059		
Elemento Magnésio				
Ausente	1			
Presente	0.044 (0.004-0.498)	0.012		
OGG 1/2 citoplasmática				
Fraca	1			
Forte	9.043(2.577-31.730)	0.001		
Consumo atual de tabaco				
Não			1	
Sim			3.765(1.179-12.021)	0.025
SOD-1 citoplasmática				
Fraca			1	
Forte			10.377(1.151-93.590)	0.037
OGG1/2 nuclear				
Fraca			1	
Forte			5.733(1.829-17.971)	0.003

A expressão forte da proteína Trx mostrou associação com o consumo atual de tabaco e a presença do elemento cromo (OR= 10.363; IC=2.991-35.902, OR= 3,208; IC=1,049-9,806, respectivamente). A expressão nuclear forte de Trx aumentou em aproximadamente 8 vezes a expressão citoplasmática forte de Trx (OR=7.880; IC=1.921-32.321). Para a análise da influência na expressão nuclear forte da proteína Trx foi possível observar que a expressão citoplasmática de SOD-1 reduziu em aproximadamente 6 vezes a expressão de Trx (OR=0.173; IC=0.045-0.659). Já a

expressão citoplasmática forte dessa proteína, aumentou em aproximadamente 6 vezes a sua expressão nuclear forte (OR=5.955; IC= 1.701-20.840). (Tabela 5).

Tabela 6: Análise multivariada da expressão da proteína Trx em relação ao estilo de vida, caracterização elementar e outras proteínas.

Característica	Análise multivariada			
	Trx citoplasmática forte		Trx nuclear forte	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Consumo de tabaco atual				
Sim	1			
Não	10.363(2.991-35.902)	0.000		
Elemento Cromo				
Ausente	1			
Presente	3.208(1.049-9.806)	0.041		
Trx nuclear				
Fraca	1			
Forte	7.880(1.921-3.321)	0.004		
SOD-1 citoplasmática				
Fraca			1	
Forte			0.173(0.045-0.659)	0.010
Trx citoplasmática				
Fraca			1	
Forte			5.955(1.701-20.840)	0.005

Discussão

O processo metabólico celular gera normalmente espécies reativas de oxigênio (ERO), além disso, indivíduos com exposição crônica ao cigarro possuem a produção de ERO elevada nas células, isso se deve a presença de substâncias do tipo, hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos e cetonas e alguns metais, por exemplo, arsênico (As), níquel (Ni) e cromo (Cr) presentes na composição do cigarro, nos resíduos de alcatrão e também absorvidos na forma inalatória do hábito tabagista (BANDEIRA et al., 2018).

A maioria dos pacientes analisados em nosso estudo apresentam ou apresentaram o hábito tabagista em suas vidas, é sabido que o cigarro é responsável por causar diversas doenças, incluindo o câncer (HECHT, 2003).

O mecanismo de defesa de primeira linha para evitar danos celulares causados por ERO é o aumento da expressão de SOD-1, transformando espécies reativas em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao qual é reduzido em seguida a H_2O e O_2 (PRYOR e STONE, 1993; HECHT, 2003; SEET et al., 2011; ALEXANDROV et al., 2016; WENG et al., 2018). No entanto, quando não ocorre essa conversão completa em H_2O e O_2 do peróxido de hidrogênio, pode ocorrer a redução a um oxidante muito forte, o radical hidroxila ($OH\cdot$) (VAN LOON et al., 2010).

O radical hidroxila livre no ambiente celular pode reagir com a base guanina (G), formando a 7,8-di-hidro-8-oxo-guanina (8-oxo-G) (DAVID et al., 2007; SEET et al. 2011; PRYOR e STONE, 1993). Van Loon e colaboradores (2010), afirmam que 8-oxo-G é mutagênica devido à sua forte capacidade de imitar funcionalmente timina causando uma mutação de transversão durante a replicação do DNA. O reconhecimento e remoção da base danificada é catalisado por uma DNA glicosilase denominada OGG 1 (DAVID et al., 2007).

Mediante a todo esse mecanismo, em defesa ao estresse gerado pelo consumo de tabaco, parece plausível pensar que o aumento da expressão de SOD-1 esteja atuando também no aumento das concentrações do radical hidroxila e todo esse mecanismo de interação espécies reativas e remoção do dano explicaria a

associação da expressão forte de SOD-1 no citoplasma influenciar a expressão forte de OGG1/2 no núcleo em nosso estudo.

No presente estudo observou-se uma associação entre a expressão forte da proteína OGG1/2 e SOD-1 no citoplasma, Akino e colaboradores (2018), mostram uma relação entre o aumento da expressão de ambas as proteínas através da via Nrf2. Em resposta ao estresse oxidativo Nrf2 é translocada para o núcleo onde irá transcrever genes antioxidantes, dentre eles a superóxido dismutase (SOD), catalase e 8-Oxoguaninaglicosilase de DNA (OGG1) (MENEGON et al., 2016; CHEN et al., 2015; SINGH et al., 2013).

Outro ponto observado no estudo foi à expressão da proteína SOD-1 no núcleo. Tsang e colaboradores (2014) demonstram que ATM / Mec1 regulam a localização nuclear de SOD-1 em resposta a concentrações elevadas de H₂O₂ em leveduras e humanos, e sua presença nessa região faz com que SOD-1 se ligue a regiões promotoras de DNA regulando a expressão gênica, que é importante para a resistência a danos oxidativos no DNA.

A expressão nuclear forte de Trx diminui a expressão citoplasmática forte de SOD-1, a proteína Trx desempenha um papel importante no equilíbrio redox celular e de sinalização em células normais e células tumorais diminuindo as espécies reativas no citoplasma (HANSCHMANN et al., 2013; LU e HOLMGREN, 2014; MONTEIRO et al., 2017). Já no citoplasma através da reação redox reversível, Trx pode regular a atividade de vários substratos protéicos em numerosas vias, incluindo membros da família peroxirredoxina que visam a degradação do peróxido de hidrogênio, além de ativar vias para eliminação de ERO a Trx inibe diretamente as proteínas pro apoptóticas, como a ASK1 (RHEE et al. 2005; TONISSEN e TRAPAN, 2009).

Além de entender os possíveis mecanismos das interações proteína-proteína e associações com hábitos de vida, nosso estudo destaca a caracterização elementar nos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. A caracterização possibilita detectar os elementos presentes no tumor e posteriormente elucidar mecanismos moleculares que possivelmente estejam sendo regulados por esses elementos nos tumores.

O elemento cromo está associado ao histórico de consumo de tabaco (tabela suplementar 1 e 2). Estudos demonstram que o cromo é responsável pela indução do estresse oxidativo ou oxidação do DNA na presença de concentrações supra-fisiológicas (O'BRIEN, 2003; ZHITKOVICH; 2005; SUN et al., 2015). Mediante a isso, é possível entender o aumento da expressão de Trx e Ref-1, que atuam evitando os danos causados por ERRO no cancer oral.

O magnésio está relacionado ao hábito tabagista (tabela suplementar 2) e atua na diminuição da expressão forte da proteína OGG1/2, estudos relatam que o magnésio possui propriedade de estabilização do DNA, o Mg^{2+} interage com as purinas no local N7 (Metal-DNA), formando uma ligação química de estabilização da dupla-hélice, além disso, essa ligação não permite a aproximação de desnaturantes, protegendo a molécula dos ataques nessa posição (ANASTASSOPOULOU e THEOPHANIDES, 2002; ANASTASSOPOULOU, 2003). O elemento atua protegendo os danos ao DNA e conseqüentemente a diminuição da atuação da proteína OGG1/2. Estudos comprovam a baixas concentrações de Mg^{2+} com o câncer (LEONE et al., 2006, ANASTASSOPOULOU e THEOPHANIDES, 2002).

O elemento níquel em nosso estudo foi responsável por reduzir a expressão nuclear da proteína de Ref-1. A presença do níquel pode contribuir para a carcinogênese por meio de alvos transcritoriais de resposta a hipóxia que promovem a angiogênese, a reprogramação metabólica e o crescimento do tumor (SCANLON et al. 2017). Scanlon e Glazer (2015), demonstram que a repressão das vias de reparo de DNA é um mecanismo adicional pelo qual a hipóxia contribui para a tumorigênese.

Chan e colaboradores (2014), revelaram que a hipóxia em câncer colorretal, pode controlar a expressão de genes de reparo do DNA através das mudanças específicas na eficiência da tradução dos transcritos de mRNA mais especificamente APE1 OGG1. O mecanismo proposto pelos autores pode explicar a interação do níquel na diminuição de Ref-1 em tumores orais. As deficiências de reparo de DNA induzidas por hipóxia geram instabilidade genômica, o que leva a um comportamento mais agressivo do câncer (CHAN et al., 2014).

Conclusão

Os presente trabalho reforça a associação do habito tabagista, tradicionalmente conhecido por sua relação com o câncer de cavidade oral, na expressão de proteínas envolvidas na via de estresse oxidativo (SOD-1 e Trx) e reparo do DNA (OGG1/2). Os achados de caracterização quanto à presença de elementos abrem perspectivas para melhor entendimento da biologia tumoral e sua associação com as proteínas do estudo.

A presença do cromo aumenta a expressão de Ref-1 e Trx que são proteínas que atuam em mecanismos de progressão tumoral. Já as alterações induzidas por Níquel em padrões de expressão gênica podem ser uma ferramenta útil para identificar padrões de desregulação que precedem a identificação clínica de cânceres induzidos por Níquel. Já o elemento magnésio atua como protetor dos danos causados por ERO.

Referências Bibliográficas

AKINO, N. et al. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 470, 96–104, 2018.

ALEXANDROV, L. B. et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. **Science**, 354:618–22, 2016.

ANASTASSOPOULOU, J.; THEOPHANIDES, T. Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 1, p. 79-91, 2002.

ANASTASSOPOULOU, Jane. Metal–DNA interactions. **Journal of Molecular Structure**, v. 651, p. 19-26, 2003.

ASFAR, T. et al. National estimates and correlates of secondhand smoke exposure in US cancer survivors. **J Cancer Surviv**, 11:469–476, 2017.

CHAN N., M. ALI, G.P. MCCALLUM, *et al.* Hypoxia provokes base excision repair changes and a repair-deficient, mutator phenotype in colorectal cancer cells. **Mol Cancer Res**, 12 (10), pp. 1407-1415. 2014.

CHEN, B. et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **J Endocrinol**, 32. 225(3): p. R83-99, 2015.

CHEN, H. I. et al. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. **J. Occup. Health**. 49, pp. 389–398, 2007.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941, 2007.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V.L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, 447, pp. 941-950, 2007.

E.D. Schmid, F.W. Schneider, F.Siebert (Eds.), Spectroscopy of biological molecules—new advances, Wiley, Chichester, pp. 433-438. 1987.

HALLIWELL, B.; POULSEN, H.E. **Cigarette Smoke and Oxidative Stress**. Springer, New York, 2006.

HANSCHMANN, E. M. et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxid Redox Signal**, 19, pp. 1539-1605, 2013.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nat Rev Cancer**, 3:733–44, 2003.

HECHT, Stephen S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 733, 2003.

KATAKWAR, P. et al. Oxidative stress marker in oral cancer: a review. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438, 2016.

LEONE, N., COURBON, D., DUCIMETIERE, P., & ZUREIK, M. Zinc, Copper, and Magnesium and Risks for All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Mortality. **Epidemiology**, 17(3), 308–314.doi:10.1097/01.ede.0000209454.41466.b. 2006.

LU, J.; HOLMGREN, A. Thethioredoxin antioxidant system. **Free Radic Biol Med**, 66, pp. 75-87, 2014.

MAJEWSKA, U. et al. An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection x-ray fluorescence. *Biological trace element research*; 60(1–2):91–100, 1997.

MENEGON, S.; COLUMBANO, A.; GIORDANO, S. The dual roles of NRF2 in cancer. **Trends Mol Med**, 22(7):578–93, 2016.

MOFFATT, R. J.; OWENS, S. G. Cessation from cigarette smoking: changes in body weight, body composition, resting metabolism, and energy consumption. *Metab Clin Exp* 1991;40:465–70. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Ann NY Acad Sci**, 686:12–27, 1993.

MONTEIRO, H.P.; OGATA, F.T.; STERN, A. Thioredoxin promotes survival signaling events under nitrosative/oxidative stress associated with cancer development. **Biomed. J.**, 40, 189–199, 2017.

O'BRIEN T. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. **Mutat Res/Fundam Mol Mech Mutagen**.533:3–36. 2003.

POPRAC, P. et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Ann NY Acad Sci**; 686:12–27, 1993.

QIN, X. et al. Coexpression of growth differentiation factor 11 and reactive oxygen species in metastatic oral cancer and its role in inducing the epithelial to mesenchymal transition. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. Jun;123(6):697-706, 2017.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 148, p. 183-193, 2016.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling, **Free Radic. Biol. Med.** 38, 1543 – 1552, 2005.

SARDARO, N. et al. Oxidative Stress and Oral Mucosal Diseases: An Overview. **In vivo**, 33: 289-296, 2019.

SCANLON, S. E., & GLAZER, P. M. Multifaceted control of DNA repair pathways by the hypoxic tumor microenvironment. **DNA repair**, 32, 180–189. 2015.

SCANLON, SE, SCANLON, CD, HEGAN, DC, SULKOWSKI, PL, GLAZER, PM. Nickel induces transcriptional down-regulation of DNA repair pathways in tumorigenic and non-tumorigenic lung cells. **Carcinogenesis**. 38: 627– 637. 2017

SEET, R.C. et al. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? **Free Radic Biol Med**, 50, pp. 1787-1793, 2011.

SINGH, B. et al. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. **BMC Cancer**, 13: p. 253, 2013.

SUN, H; BROCATO, J; COSTA, M. Oral chromium exposure and toxicity. **Current environmental health reports**, v. 2, n. 3, p. 295-303, 2015

TALHOUT, R. et al. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. **Int J Environ Res Public Health**. 8(2): 613–628, 2011.

TONISSEN, K.F.; TRAPANI, D. G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. **Mol. Nutr. Food Res**, 53, pp. 87-103, 2009.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nat. Commun**, 5, p. 3446, 2014.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact**. 160 ;1–40, 2006.

van LOON, B., MARKKANEN, E. & HÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair** 9, 604–616, 2010.

WENG, M. W. et al. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. Jul 3;115(27):E6152-E6161, 2018.

WHITAKER, A. M. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 22, p. 1493, 2017.

ZHITKOVICH A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). **Chem Res Toxicol**.18:3–11. 2005.

Tabela suplementar 1

Tabela 1- Caracterização elementar das amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral, estratificada pelo histórico de consumo tabagista.

Elemento	Já consumiu tabaco?				P value
	Não		Sim		
	N	(%)	N	(%)	
Magnésio					
Ausente	12	85,71	57	89,06	0,722
Presente	2	14,29	7	10,94	
Fósforo					
Ausente	2	14,29	3	4,69	0,184
Presente	12	85,71	61	95,31	
Enxofre					
Ausente	0	0,00	1	1,56	0,638
Presente	14	100,00	63	98,44	
Cloro					
Ausente	11	78,57	39	60,94	0,213
Presente	3	21,43	28	39,06	
Potássio					
Ausente	5	35,71	9	14,06	0,056
Presente	9	64,29	55	85,94	
Cálcio					
Ausente	1	7,14	0	0,00	0,179
Presente	13	92,86	64	100,00	
Cromo					
Ausente	13	92,86	32	50,00	0,003
Presente	1	7,14	32	50,00	
Manganês					
Ausente	12	85,71	40	66,67	0,095
Presente	2	14,29	26	33,33	
Ferro					
Ausente	0	0,00	0	0,00	1,000
Presente	14	100,00	64	100,00	
Cobalto					
Ausente	10	71,43	59	92,19	0,050*
Presente	4	28,57	5	7,81b	
Níquel					
Ausente	13	92,86	54	84,38	0,409
Presente	1	7,14	10	15,63	
Cobre					
Ausente	1	7,14	3	4,69	0,706
Presente	13	92,96	61	95,31	
Zinco					
Ausente	0	0,00	0	0,00	1,000
Presente	14	100,00	64	100,00	
Arsênio					
Ausente	8	57,14	17	26,56	0,026*
Presente	6	42,86	47	73,44	
Bromo					
Ausente	8	57,14	17	26,56	0,026*
Presente	6	42,86	47	73,44	
Total	14	100,00	64	100,00	

Teste Qui-quadrado. *p ≤ 0,05

Tabela suplementar 2

Tabela 2- Caracterização elementar das amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral, estratificada pelo hábito tabagista.

Elemento	Hábito tabagista						P value
	Nunca		Parou		Atual		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Magnésio							
Ausente	14	100,00	15	65,22	40	97,56	0,000*
Presente	0	0,00	8	34,78	1	2,44	
Fósforo							
Ausente	1	7,14	1	4,35	3	7,32	0,891
Presente	13	92,86	22	95,65	38	92,68	
Enxofre							
Ausente	0	0,00	1	4,35	0	0,00	0,298
Presente	14	100,00	22	95,65	41	100,00	
Cloro							
Ausente	12	85,71	14	60,87	24	58,54	0,174
Presente	2	14,29	9	39,13	17	41,46	
Potássio							
Ausente	4	28,57	3	13,04	7	17,07	0,480
Presente	10	71,43	20	86,96	34	82,96	
Cálcio							
Ausente	1	7,14	0	0,00	0	0,00	0,099
Presente	13	92,86	23	100,00	41	100,00	
Cromo							
Ausente	13	92,86	9	39,13	23	56,10	0,006*
Presente	1	7,14	14	60,87	18	43,90	
Manganês							
Ausente	14	100,00	10	43,48	28	68,29	0,002*
Presente	0	0,00	13	56,52	13	31,71	
Ferro							
Ausente	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1,000
Presente	14	100,00	23	100,00	41	100,00	
Cobalto							
Ausente	12	85,71	18	78,26	39	95,12	0,121
Presente	2	14,29	5	21,74	2	4,88	
Níquel							
Ausente	14	100,00	20	86,96	33	80,49	0,191
Presente	0	0,00	3	13,04	8	19,51	
Cobre							
Ausente	1	7,14	1	4,35	2	4,88	0,927
Presente	13	92,86	22	95,65	39	95,12	
Zinco							
Ausente	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1,000
Presente	14	100,00	23	100,00	41	100,00	
Arsênio							
Ausente	9	64,29	4	17,39	12	29,27	0,011*
Presente	5	35,71	19	82,61	29	70,73	
Bromo							
Ausente	9	64,29	4	17,39	12	29,27	0,011*
Presente	5	35,71	19	82,61	29	70,73	
Total	14	100,00	23	100,00	41	100,00	

Teste Qui-quadrado. *p ≤ 0,05

CAPÍTULO 2: CHLORINE AND CHROMIUM ELEMENTS AND PROTEINS OF OXIDATIVE STRESS AND DNA REPAIR PATHWAYS ARE RELATED TO TUMOR AGGRESIVENESS AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH ORAL CANCER.

Artigo submetido: Oral Oncology

CHLORINE AND CHROMIUM ELEMENTS AND PROTEINS OF OXIDATIVE STRESS AND DNA REPAIR PATHWAYS ARE RELATED TO TUMOR AGGRESIVENESS AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH ORAL CANCER.

Authors: Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis¹, Anderson Barros Archanjo¹, Suzanny Oliveira Mendes¹, Rafael Pereira de Souza², Rafael de Cicco², Mayara Mota de Oliveira¹, Joaquim Gasparini, Aline Ribeiro Borçoi¹, Ivana Alece Arantes Moreno¹, Lucas de Lima Maia¹, Gabriela Tonini Peterle¹, Juliana Dalbó¹ Kelly Cristina Saito³, Edna Teruko Kimura³, Marcos Brasilino de Carvalho⁴, Fábio Daumas Nunes⁵, Eloiza Tajara⁶, Marcelo dos Santos⁷, Leonardo Oliveira Trivilin⁸, Christiano Jorge Gomes Pinheiro⁹, Adriana Madeira Álvares-da-Silva¹, Breno Valentim Nogueira¹

Affiliations:

¹Graduate Program in Biotechnology/RENORBIO, Federal University of Espírito Santo

²Cancer Institute Arnaldo Vieira de Carvalho

³Department of cellular Biology and Development, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo

⁴Molecular Biology Laboratory, Heliópolis Hospital

⁵Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo

⁶Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto

⁷Multicampi School of medical Sciences of Rio Grande do Norte, Federal University of Rio Grande do Norte

⁸Department of Veterinary Medicine, center of Agrarian Sciences and Engineering, Federal University of Espírito Santo

⁹Department of Rural Engineering, center of Agrarian Sciences and Engineering, Federal University of Espírito Santo

Corresponding author

Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis
Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo.
Alto Universitário, S/N,
29500-000 Alegre, ES, Brasil
e-mail: aricaleone@hotmail.com

Cel.: +55-27-997037191

Abstract

Objectives: The purpose of this study was to analyze the association of trace element and protein expression of repair and oxidative stress pathways with tumor aggressiveness and prognostic in patients with oral cavity tumors.

Methods: For this, Elemental characterization by μ -XRF was verified, as well as clinical characteristics and expression of SOD-1, Ref-1, OGG1 / 2 and TRX proteins.

Results: Chlorine and chromium elements were related to tumor recurrence. Perineural and vascular invasion were important indicators for aggression and tumor prognosis. Expression of SOD-1, Trx and Ref-1 showed a prognostic relationship with tumor growth. Alcoholic habit and vascular invasion had an impact on disease-free and disease-specific survival.

Conclusion: Data lead to a better understanding of tumor signaling pathways and their relationship to prognosis of oral cancer.

Keywords: metal trace, oxidative damage, repair enzymes, squamous cells cancer.

Introduction

Oral cancer is the sixth most common cancer in the world and affects individuals between fifth and seventh decades of life. Squamous cell carcinoma (SCC) is among the most common histopathological types. Only in 2018 about 354,864 new cases worldwide were diagnosed with 177,384 individuals died. Treatment is indicated mainly by evaluation of TNM system and can be surgical, plus radiotherapy and chemotherapy [1,2]. However, despite of improvement in examinations, treatment and quality of life, in the last decades, the overall survival rate of individuals affected remained at 5 years after diagnosis [3,4].

Regarding the risk profile for the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC), it is possible to emphasize mainly the habit of tobacco and/or alcohol consumption and HPV infection, in addition to genetic susceptibility [5]. Smoking is globally recognized as one of the main risk factors for the development of oral cavity neoplasias, among them the OSCC. This is due to the fact that cigarette smoke contains more than 7000 chemical substances in its composition, of which 69 have already been characterized as carcinogenic and co-carcinogenic [6].

Studies focus on metal-induced toxicity in carcinogenicity, emphasizing its role in generation of reactive oxygen species in biological systems, the formation of free radicals mediated by metals can cause various modifications in DNA bases, increase of lipid peroxidation and changes in homeostasis of calcium and sulfhydryl [7].

In addition to these substances, there metalloids and non-essential metals introduced into the body by smoke and can promote the production of reactive oxygen species (ROS), harmful to DNA, membrane and cellular homeostasis [7]. The disparity in the production and degradation of ROS is characterized as oxidative stress, related to inflammation and cancer [8]. Enzymes involved in protection against damage from oxidative stress such as SOD-1 and Trx, and DNA repair as Ref-1 and OGG are important regulators of defense mechanisms to cell damage and repair and prevention of cancer. These enzymes are also reported as possible therapeutic targets and guidelines for the prognosis in breast cancer [9].

SOD-1 is responsible for catalyzing the dismutation of superoxide radical into oxygen and hydrogen peroxide (H₂O₂) [9]. Metals in the intracellular medium react with H₂O₂ generating hydroxyl radical (OH⁻), capable of acting in direct damages to the DNA. These damages can be repaired via Ber through OGG1 glycosylase, which excises the modified base [10]. Ref-1 protects the sequence of enzymatic degradation until until specific enzymes complete the repair [11]. Trx is responsible for reducing and activating Ref-1 demonstrating its importance in cell protection [11, 12].

In this way, the understanding of pathways which connect cancer to patient's habits and cellular environment are fundamental for the understanding of tumor biology, its prognostic factors and predictors favoring the formulation of more personalized clinical care [13].

In this context, we aimed to study the influence of lifestyle factors, DNA control and repair proteins, oxidative stress signaling pathway and elemental characterization, associating them with clinical-pathological and prognostic characteristics in patients with squamous cell carcinoma of oral cavity.

Casuistry and methods

Ethics

The present study was approved by Ethics Comittee on Human Research, the Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, under number 1.359.363 and from Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute (ICAVC), under number 1.422.077. An informed consent was obtained from all patients enrolled.

Sample

The collection of clinical and epidemiological data, as well as tumor samples from patients diagnosed with oral cavity squamous cell carcinoma were obtained from the Genome Head and Neck Project (GENCAPO), a multi-institutional and multidisciplinary group that has been active since 2002. Therefore, in this study, 78 tumoral tissue samples were obtained of patients with oral squamous cell carcinoma, surgically treated at the Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute (ICAVC), São Paulo, Brazil, between January 2012 and May 2015.

All cases have histological confirmation by means of a new histopathological analysis and diagnosis, with a minimum follow-up of 24 months from the initial treatment, performed according to the routine established by the ICAVC Pathology Service.

The study sample consisted of individuals, mostly males (69.23%) with a mean age of 63.69 years (SD \pm 11.01 years). About the habits, 52.56% were smokers and 43.59% consume some type of alcoholic beverage. As for the clinical-pathological characteristics, 32,10% presented tumor size pT1, 33,34% presented lymph node involvement. In relation to the invasion, 34.62% had perineural invasion, 23% had vascular invasion. For prognostic characteristics, 19.23% presented recurrence and 35.99% died of cancer (Table 1).

Table 1: Epidemiological, clinicopathological and prognostic characteristics of patients with oral squamous cell carcinoma.

Characteristics	Total	
	N.	(%)
Gender		
Female	24	30.77
Male	54	69.23
Age, years		
Mean		63.69
Standard Deviation		±11.01
Median		63
Smoking		
Never	14	17.95
Yes, in the past	23	29.49
Yes, currently	41	52.56
Consumption of alcoholic beverages		
Never	17	21.79
Yes, in the past	27	34.62
Yes, currently	34	43.59
Tumor size (pT)*		
pT1	25	32.10
pT2	19	24.40
pT3	17	21.80
pT4	17	21.80
Lymph node (pN)*		
Negative	52	66.66
Positive	26	33.34
Vascular Invasion		
Absent	55	70.50
Present	18	23.00
Not evaluable	5	6.50
Aggressiveness		
Less aggressive	18	23.08
More aggressive	14	17.95
Not evaluable [§]	46	58.97
Perineural Invasion		
Absent	43	55.13
Present	27	34.62
Not evaluable [§]	8	10.26
Recurrence		
No	63	80.77
Yes	15	19.23
Death due to illness		
No	50	64.11
Yes	28	35.99
Total	78	100.00

* TNM Classification (7th edition); [§]Did not enter in statistical calculations

Tissue microarrays

Tissue microarrays (TMA) were made as previously described [14], with selection of two representative tumor areas evaluated by two experienced pathologists from slides stained with Hematoxylin and Eosin, and then two 1.5 mm diameter cylinders of each patient were added to the receptor block.

Elementary Characterization

For the elementary characterization, the synchrotron radiation-based μ -XRF technique was used to detect chemical elements from electron excitation energy absorption, which is specific for each element. To obtain the spectra, a white beam with a power range of 4 to 24 keV and dimensions of 2 mm² was applied to the samples for 20 seconds and excited the electrons. Nine measurements in a 3x3 matrix were performed and later an averaging was performed to obtain the final spectrum used in analyzes. For adjustment of characteristic X-ray spectra, determination of elements and their respective fluorescent intensities, an analysis of a certified reference sample was carried out, *Standard Reference Material*[®] 1577b “*Bovine Liver*”, produced by *National Institute of Standards and Technology* (NIST), under the same conditions as the test samples, PyMca 5.0.0 software program [15] was the basis for analyzes. Measurements of μ XRF were performed in D09-XRF X-Ray Fluorescence light line at the National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil [16]. Spectra were obtained by the average of nine measured points and analysis was performed in program PyMca 5.0.0. The analysis was performed at the National Laboratory of Synchrotron Light, Campinas-SP, Brazil.

Immunohistochemistry

Antibodies anti-SOD- 11:400 (SC-11407, Santa Cruz), anti-Ref-1 1:400 (SC-17774, Santa Cruz), anti-OGG1/2 1:100 (SC- 376935, Santa Cruz) and anti-Trx 1:100 (SC-166393, Santa Cruz) were used in immunohistochemistry reaction with REVEAL Polymer-HRP (Spring Bioscience), according to the manufacturer's protocol. For each reaction negative controls (absence of primary and secondary antibody) were used.

Protein expression was evaluated by two different analyzers independently, and conflicting cases were re-analyzed. Protein analysis was semiquantitative so that samples were classified according to percentage of cells stained at: 0 (0% of labeled cells), 1 (<10%); 2 ($10 \leq 50\%$) and 3 (>50% of labeled cells); and by staining intensity in: 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate) and 3 (strong).

Scores received from percentage and staining intensity were multiplied and their means calculated for each sample. Then, based on the final score, each sample was categorized as negative (0), weak positive ($1 \leq 3$) or strong positive (>3), according to methodology used by studies that performed similar analyzes to the present study [17, 18].

Statistical Analysis

For association tests, Chi-square test was used in bivariate analysis and, when necessary, Fisher's exact test, with a 5% margin of error and with Bonferroni correction. Multivariate logistic regression by modeling was used to adjust odds ratio (OR) and confidence interval (95% CI). The pivotal variables that obtained a p-value of less than 20% ($p < 0.20$) were inserted by the backward method in multivariate logistic regression model, with the significant variables remaining at the end of the model, at each stage ($p < 0.05$).

For disease-specific survival analysis, it was calculated the time interval (in months) between dates of surgery and death by disease of each patient or the last return in cases of survivors. The time interval for disease-free survival analysis was calculated using as end points the dates of global relapse, or the date of the last return in asymptomatic cases. Survival curves were evaluated according to Kaplan-Meier model and Wilcoxon p-value. Mathematical calculations were performed using IBM, SPSS, STATISTICS® v. 20, 2011.

Results

Elementary characterization revealed presence of magnesium in 11.54% of sample, phosphorus in 93.59%, sulfur in 98.72%, chlorine in 35.90%, potassium in 82.72%, calcium in 98.72%, chromium in 42.31%, manganese in 33.33%, iron and zinc in all samples, cobalt in 11.54%, nickel in 14.10%, copper in 94.87%, arsenic and bromine in 67.95% of analyzed sample. All studied proteins showed positive expression in oral squamous cell carcinoma.

In multivariate analysis it was possible to observe an association of lymph node involvement with vascular invasion ($p=0.000$), in which presence of vascular invasion increased 47-fold the lymph node involvement ($OR=47.16$, $CI=8.356-266.17$). For tumor size, there was a positive association of cytoplasmic expression of SOD-1 and Trx proteins ($p=0.034$ and 0.033 , respectively) and Ref-1 nuclear expression ($p=0.034$) (Table 2).

Data showed that strong nuclear and cytoplasmic expression of all analyzed proteins favors tumor growth. SOD-1 cytoplasmic expression contributes approximately 5-fold to tumor increase ($OR=4.63$, $CI=1.126-19.08$), while Trx strong cytoplasmic expression favors 3-fold ($OR=3.00$, $CI=1.09-8.24$) and Ref-1 nuclear expression increases tumor growth by approximately 6-fold ($OR=6.12$, $CI=1.14-32.83$) (Table 2).

Regarding aggressiveness, multivariate analysis revealed that presence of vascular invasion ($p=0.022$) increased in approximately 15-fold tumor aggressiveness ($OR=15.63$, $CI=1.49-164.3$). The risk of vascular invasion ($p=0.001$) is increased 10-fold in patients with perineural invasion ($OR=10.303$, $CI=2.74-38.605$) (Table 2).

Table 2: Multivariate analysis concerning lymph node, tumor size, aggressiveness and vascular invasion with clinicopathological characteristics, life habits and protein expression.

Features	Multivariate analysis			
	Lymph node	Tumor Size	Aggressiveness	Vascular Invasion
Smoking				
Yes / No ¹				
OR	3.38	-	-	-
CI 95%	0.81-14.09			
P value	0.093			
Tumor size				
≥ pT3 / ≤ pT2 ¹				
OR	-	-	-	2.31
CI 95%				0.62-8.58
P value				0.211
Vascular invasion				
Present / Absent ¹				
OR	47.16	-	15.67	-
CI 95%	8.35-266.17		1.49-164.3	
P value	<0.001		0.022	
Perineural invasion				
Present / Absent ¹				
OR	-	-	-	10.30
CI 95%				2.74-38.60
P value				0.001
Trx Nuclear				
Strong / Weak ¹				
OR	1.14	-	-	-
CI 95%	0.256-5.11			
P value	0.861			
SOD-1 Cytoplasmic				
Strong / Weak ¹				
OR	-	4.63	-	2.81
CI 95%		1.12-19.08		0.28-28.34
P value		0.034		0.380
Trx Cytoplasmic				
Strong / Weak ¹				
OR	-	3.00	-	-
CI 95%		1.09-8.24		
P value		0.033		
Ref-1 Nuclear				
Strong / Weak ¹				
OR	-	6.12	-	-
CI 95%		1.14-32.83		
P value		0.034		
Potassium				
Present / Absent ¹				
OR	-	-	0.15	-
CI 95%			0.01-2.04	
P value			0.158	

¹ Reference variable.

In multivariate analysis, there was a significant association between relapse and age ($p=0,029$), current alcohol consumption ($p=0.040$), vascular invasion ($p=0.009$), chlorine $p=0.034$), chromium ($p=0.024$) and OGG1/2 cytoplasmic expression ($p=0.007$) (Table 3).

Age greater than 63 years showed a protective factor for tumor recurrence (OR=0.135, CI=0.022-0.812), as well as the presence of chlorine (OR=0.076, CI=0.007-0.827) which decreases chances of relapse by about 13 times. It was also observed that OGG1/2 strong cytoplasmic expression behaved as a protection factor for recurrence (OR=0.041, CI=0.004-0.414) (Table 3).

Current alcohol consumption was a risk factor for recurrence, leading to an approximately 9-fold increase in chance of relapse (OR=8.437, CI=1.098-64.806). The same can be observed for vascular invasion, which there was an increase of approximately 13-fold (OR=13,516 CI=1,900-96,129). in the chance of relapse. Also as a risk factor, the presence of chromium in tumor samples gives an approximately 8-fold increase in chance of patients relapsing compared to patients with absence of this element (OR=8,003, CI=1,315-48,709) (Table 3).

In a multivariate analysis for death, it was possible to observe a significant association with current alcohol consumption ($p=0.007$), vascular invasion ($p=0.023$) and perineural invasion ($p=0.050$). Patients who currently consume alcohol increase their risk of death from cancer by 6 times (OR=6.391, CI=1.672-24.422), patients who have vascular invasion presents risk of death 6 times more than those who do not present (OR=6.072, CI=1.276-28.902), and the presence of perineural invasion increases risk of death 4 times in patients with cancer (Table 3).

Table 3: Multivariate analysis between prognostic, clinicopathological characteristics, life habits and protein expression

Features	Multivariate analysis	
	Relapse	Death
Age		
> 63 / ≤ 63 ¹		
OR	0.135	-
CI 95%	0.022-0.812	
P value	0.029	
Current alcohol consumption		
Yes / No ¹		
OR	8.437	6.391
CI 95%	1.098-64.806	1.672-24.422
P value	0.040	0.007
Vascular invasion		
Present / Absent ¹		
OR	13.516	6.072
CI 95%	1.900-96.129	1.276-28.902
P value	0.009	0.023
Perineural invasion		
Present / Absent ¹		
OR		4.054
CI 95%	-	1.00-16.443
P value		0.050
Chlorine		
Present / Absent ¹		
OR	0.076	-
CI 95%	0.007-0.827	
P value	0.034	
Chrome		
Present / Absent ¹		
OR	8.003	-
CI 95%	1.315-48.709	
P value	0.024	
OGG1/2 Cytoplasmic		
Strong / Weak ¹		
OR	0.041	
CI 95%	0.004-0.414	-
P value	0.007	
SOD-1 Cytoplasmic		
Strong / Weak ¹		
OR	-	2.592
CI 95%		0.458-14.654
P value		0.281
Trx Cytoplasmic		
Present / Absent ¹		
OR	-	1.972
CI 95%		0.568-6.841
P value		0.285

¹ Reference variable.

Vascular invasion was associated with disease-free survival ($p = 0.001$, Fig. 1A) and disease-specific survival ($p=0.000$, Fig. 1B). In multivariate analysis,

vascular invasion proved to be a risk factor for worse survival. In disease-free survival the worsening is about 5 times (HR=5.108; CI=1.536-16.989; Table 4), while in disease-specific survival is approximately 3 times (HR=2.954; CI=1.164-7.499; Table 4).

Likewise, current alcohol consumption was associated with disease-specific survival ($p = 0.039$, Fig. 1C) and the multivariate analysis showed that current alcohol consumption gives patients a worse survival rate (HR=2,370, CI=1.035-5.423; Table 4). No association between current alcohol consumption and disease-free survival was observed, but multivariate analysis indicated current alcohol consumption as a risk factor for a worse disease-free survival (HR=3.247; CI=1.022-10.135). The chlorine element, in multivariate analysis, was presented as a protection factor for better disease-free survival (HR=0.210; CI=0.046-0.970; Table 4).

Table 4: Multivariate analysis disease recurrence and disease-specific survival with life habits, clinicopathological characteristics, elemental characterization and protein expression.

Features	Proportional Cox	
	Disease-free Survival	Disease-specific Survival
Current alcohol consumption		
Yes / No ¹		
OR	3.247	2.370
CI 95%	1.022-10.135	1.035-5.423
P value	0.046	0.041
Vascular invasion		
Present / Absent ¹		
OR	5.108	2.954
CI 95%	1.536-16.989	1.164-7.499
P value	0.008	0.023
Perineural invasion		
Present / Absent ¹		
OR		1.871
CI 95%	-	0.730-4.793
P value		0.192
Chlorine		
Present / Absent ¹		
OR	0.210	
CI 95%	0.046-0.970	-
P value	0.046	
Chrome		
Present / Absent ¹		
OR	2.980	-
CI 95%	0.917-9.688	
P value	0.069	
Manganese		
Present / Absent ¹		
OR	-	1.548
CI 95%		0.710-3.375
P value		0.272
Trx Cytoplasmic		
Strong / Weak ¹		
OR	2.019	-
CI 95%	0.632-6.450	
P value	0.236	

¹ Reference variable.

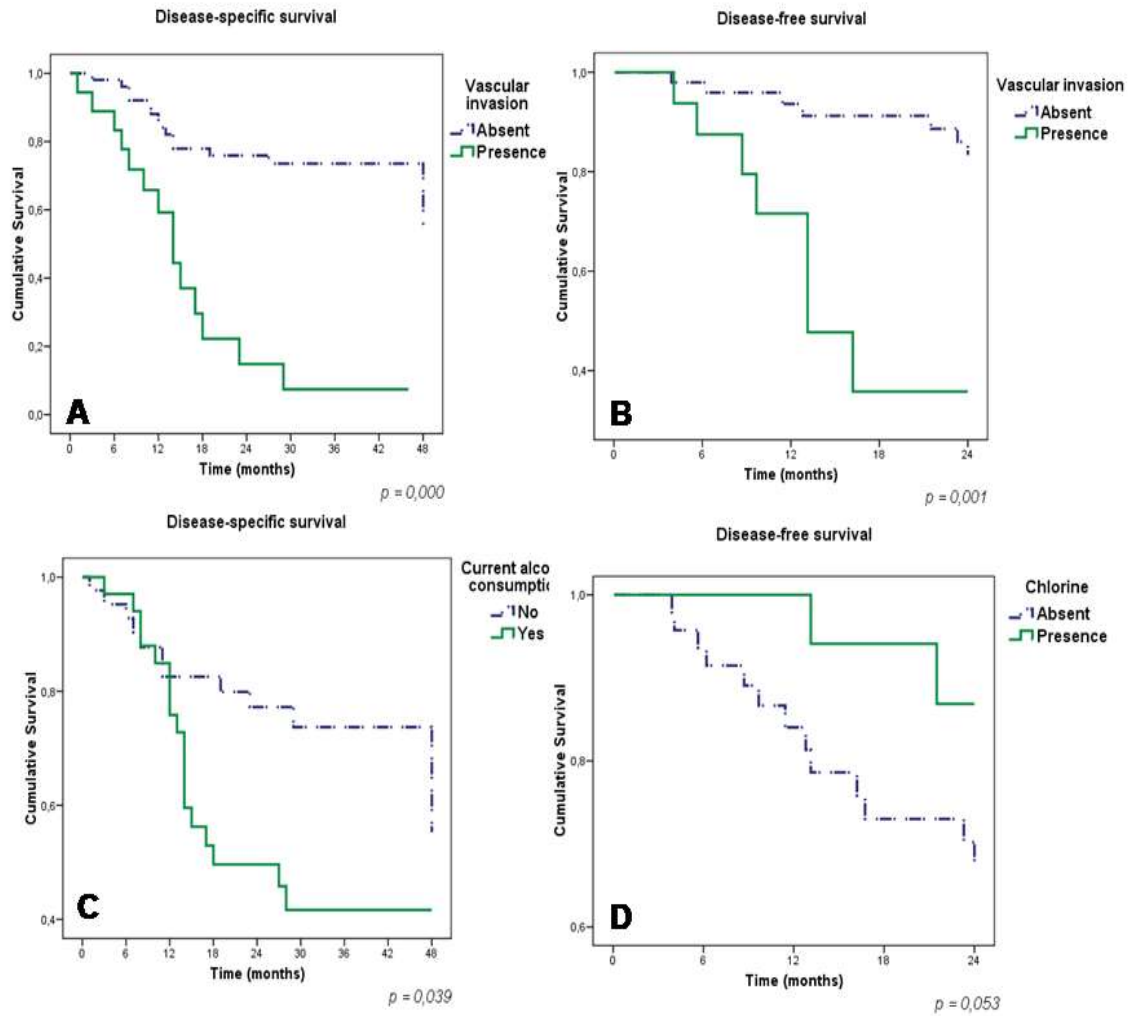


Figure 1: (A) Disease-free survival curve of patients with oral squamous cell carcinoma according to perineural invasion. (B) Disease-specific survival curve according to vascular invasion. (C) Disease-specific survival according to current alcohol consumption. Disease-free survival curve according to the chlorine element (D).

Discussion

Elemental analysis by μ -XRF showed that the presence of some chemical elements in tumor can alter disease prognosis. Thus, the chromium (Cr) element has a significant relationship with the smoking habit, a fact reported in study by Gibb et al. [19] which showed a dose response of lung cancer with exposures to hexavalent Cr, where most lung cancers occurred in smokers with synergism between exposure to chromate and other organic carcinogens as constituents of cigarette.

One of the possible explanations between Cr presence and relapse can be elucidated by the studies of Shi et al. [20,21], who affirms that the reduction of hexavalent Cr to trivalent Cr also generates oxygen radicals with activation of signaling pathways of apoptosis inhibition via PI3K and AKT. Apoptosis inhibition favors accumulation of mutations and tumor progression, which benefits the tumor microenvironment and consequently relapse.

The presence of chlorine element in our group's studies proved to be a protective factor for tumor recurrence. A possible hypothesis for this element accumulation might be the loss of chlorine ionic channels function, more specifically CLIC1. Recent studies have shown that CLIC1 is involved in cell cycle regulation, apoptosis and an important role in tumor development [22,23].

Oral cavity cancer is of multifactorial origin and presents particular characteristics in its development and therapeutic response in affected individuals. Therefore, in attempt to draw a prognostic line of disease evolution and treatment modalities, evaluation parameters were established, such as the system TNM, clinical and pathological staging, histopathological evaluation of depth of invasion, vascular invasion, perineural, necrosis and often specific histochemical and molecular markers that contribute to a better characterization of the disease [24, 25].

In our study evaluated 78 individuals with oral cancer and observed that among the clinical-pathological parameters evaluated, the presence of vascular invasion was related to worse disease-free survival and specific disease. These

findings confirm the importance of a good evaluation of the pathological aspects of tumor pieces. Vascular and perineural invasion are described in the literature as important steps in the mechanisms of relapse and metastasis and are of prognostic importance [25-30].

However, despite the great effort of the scientific community in trying to find new markers in oral cancer, the reality for this type of tumor is still somewhat unclear in relation to scientific advances found in tumors such as breast and colon which already possesses established molecular panels of therapeutic response profiles [31-34]. Although recent good studies in oral cavity cancer show perspectives of the use of therapeutic and prognostic predictive markers [35-38].

Thus, for a better understanding about signaling pathways involved in mechanisms of oral tumors, this study evaluated 4 proteins of the oxidative stress pathway and DNA repair. Analyzes showed that strong cytoplasmic expression of SOD-1 was related to 4-fold increase in tumor size. The increase in SOD-1 activity was observed in gastric and mammary tumors in relation to the worse prognosis [9,39].

Regarding oxidative stress and ROS production in tumors, literature reports a possible increase in mutation rates and tumor progression, with activation of pathways such as HIF1 α and VEGF [40]. With promotion of angiogenesis and tumor growth by activation of redox-sensitive kinases, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinases (ERKs), phosphorylation or increased cyclin D1 expression and activation of c-JUN, which are involved in the growth and survival of tumor cells [9,41].

About results of Trx analysis, it was evidenced that its strong cytoplasmic expression in oral cells was associated to increase of tumor size in 3 times. Literature shows that its protein expression is related to development and spread of cancer [42]. Trx-1 protein has redox activity and is related to activation of different transcription factors of inflammation regulation, including NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) [12]. In addition, its action may increase

expression of HIF1 α , a hypoxia transcription factor [43], possibly by inhibiting the degradation of HIF1 α [44].

Trx-1 binds and inhibits pro-apoptotic proteins, including apoptosis signal by regulating kinase-1 (Ask-1) [45]. Thus, increased expression of that protein can be seen as favoring the processes of tumor progression, which may occur by altering inflammatory factors, or by the possible activation of angiogenesis via HIF-VEGF.

Another protein analyzed in the present study, associated with the tumor increase was Ref-1. Studies have shown its increased expression in many tumor types, and this change is associated with increased tumor growth, migration, and drug resistance in tumor cells, as well as decreased patient survival [11,46]. The redox action of Ref-1 controls the activity of transcription factors, such as early-response protein-1 (Egr-1), NF- κ B, p53, HIF1 α (AP-1), which are involved in various cellular processes, including cell survival and growth [47].

In our study, OGG1/2 protein analysis was indicated as a protection factor for relapse. A study by Yuzefovych et al. (2016) [48] demonstrated that increase in OGG1 levels leads to a reduction in mitochondrial DNA damage and ROS production by decreasing the activation of p-AKT and HIF1 α , leading to a decrease in progression and metastasis of breast tumors in the rat.

Takehashi and colleagues (2017) [49] observed in genetically modified Mmh/OGG1-deficient rats when treated with Phenobarbital leads to ROS accumulation together with non-repair of oxidative damage generated in DNA by suppressing the Nrf2 pathway, thereby generating an increase in cell proliferation with the progression of hepatocellular adenocarcinoma to hepatocellular carcinoma.

In fact, the OGG1/2 protein is one of the most important enzymes acting in repair to DNA damage. This could explain the observed results, since OGG1/2 acts as a repair protein, repairing possible mutations that favors the tumor progression and relapse.

Age was also considered as a protective factor for disease relapse, decreasing risk by 7 times. It was possible to observe that members of this study had a median age of 63 years with older individuals presenting a lower recurrence. These data are in agreement with those observed by Garavello et al. (2007) [50], who found significantly higher recurrence rates and reduced survival in younger patients. However, our findings contradict most of studies found in literature in which no differences were reported in cancer-specific survival, regional relapse, and overall recurrence in patients younger than 40 years compared to older patients [51,52].

In our study, alcohol consumption was related both to recurrence and death from cancer, similar to data obtained from other studies [53]. According to the International Agency for Research on Cancer (2010) [54], most studies conducted in United States, Europe and Asia report an increased risk of oral cavity/pharyngeal cancer in association with heavy alcohol consumption, with estimates adjusted OR values ranging from 4.1 to 8.8

Regarding the survival characteristics, current consumption of alcohol by the patients is related to worst disease-free survival and disease-specific for patients with oral carcinoma. Nelson et al. [55] attributed 3.5% of cancer deaths were caused by alcohol consumption for the year 2009 in United States.

Another study corroborating our findings was conducted by Praud et al. [56], using global estimates of cancer cases and cancer deaths in which 5.5% of all cancer cases and 5.8% of all cancer cases were attributable to alcohol consumption in 2012. According to the author, alcohol consumption as a risk factor for cancer can be modulated by genetic factors, including variants in genes for alcohol metabolism, folate and methionine metabolism, and DNA.

Conclusion

Our results reinforce that evaluation of habits such as alcohol use should be considered, since it was related to worse prognosis and advanced age with less recurrence. And that prognostic factors traditionally used in clinical practice, such as histopathological evaluation of perineural and vascular invasion, appeared related to prognosis and are important in tumor evaluation.

Additionally, our findings show that new markers must be validated and can be added to usual clinical parameters and pathology, such as protein expression of oxidative stress pathway and repair. Expression of SOD1, REF-1 and TRX have been related to tumor size and OGG expression was shown to be a protective factor for relapse. Added to this, elementary characterization findings regarding the presence of elements open new perspectives for a better understanding of tumor biology and as prognostic factors, since the presence of chromium and chlorine were related to the relapse.

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).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Role of the Funding Source

This work was supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo* (Process: 71896880) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq: 315017/2018-0) - Brasil.

References

- [1] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer* 2005;104:1129–37. doi:10.1002/cncr.21324.
- [2] Lindenblatt R de CR, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço S de QC. Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med* 2012;41:34–9. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01068.x.
- [3] Liu S-A, Wang C-C, Jiang R-S, Lee F-Y, Lin W-J, Lin J-C. Pathological features and their prognostic impacts on oral cavity cancer patients among different subsites – A single institute’s experience in Taiwan. *Sci Rep* 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-08022-w.
- [4] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [5] Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer* 2014;120:1507–13. doi:10.1002/cncr.28588.
- [6] Mendel JR, Baig SA, Hall MG, Jeong M, Byron MJ, Morgan JC, et al. Brand switching and toxic chemicals in cigarette smoke: A national study. *PLoS One* 2018;13:e0189928.
- [7] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [8] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;49:1603–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- [9] Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. Immunohistochemical analysis of

- oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer* 2010;10:9. doi:10.1186/1471-2407-10-9.
- [10] David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007;447:941–50. doi:10.1038/nature05978.
- [11] Shah F, Logsdon D, Messmann RA, Fehrenbacher JC, Fishel ML, Kelley MR. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. *Npj Precis Oncol* 2017;1:19. doi:10.1038/s41698-017-0023-0.
- [12] Powis G, Kirkpatrick DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:392–7. doi:10.1016/j.coph.2007.04.003.
- [13] Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. 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 Cancer J Clin* 2017;67:93–9. doi:10.3322/caac.21388.
- [14] Cajaiba MM, Neves JI, Casarotti FF, de Camargo B, ChapChap P, Sredni ST, et al. Hepatoblastomas and Liver Development: A Study of Cytokeratin Immunoexpression in Twenty-Nine Hepatoblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 2006;9:196–202. doi:10.2350/05-12-0002.1.
- [15] Solé VA, Papillon E, Cotte M, Walter P, Susini J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 2007;62:63–8. doi:https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.12.002.
- [16] Pérez CA, Radtke M, Sánchez HJ, Tolentino H, Neuenschwander RT, Barg W, et al. Synchrotron radiation X-Ray fluorescence at the LNLS: beamline instrumentation and experiments. *X-Ray Spectrom* 1999;28:320–6. doi:10.1002/(SICI)1097-4539(199909/10)28:5<320::AID-XRS359>3.0.CO;2-1.
- [17] Soini Y, Kahlos K, Puhakka A, Lakari E, Säily M, Pääkkö P, et al.

Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 2000;83:880–6. doi:10.1054/bjoc.2000.1384.

- [18] Santos M dos, Mercante AM da C, Louro ID, Gonçalves AJ, Carvalho MB de, da Silva EHT, et al. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PLoS One* 2012;7.
- [19] Gibb HJ, Lees PSJ, Pinsky PF, Rooney BC. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 2000;38:115–26. doi:10.1002/1097-0274(200008)38:2<115::AID-AJIM1>3.0.CO;2-Y.
- [20] Shi X, Dalal NS. The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) haber-weiss cycle. *Arch Biochem Biophys* 1992;292:323–7. doi:10.1016/0003-9861(92)90085-B.
- [21] Shi X, Dalal NS. Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant systems: role of Cr(V) complexes versus tetraperoxochromate(V). *Environ Health Perspect* 1994;102:231–6. doi:10.1289/ehp.94102s3231.
- [22] Feng J, Xu J, Xu Y, Xiong J, Xiao T, Jiang C, et al. CLIC1 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via integrins/ERK pathways. *Am J Transl Res* 2019;11:557–71.
- [23] Peretti M, Angelini M, Savalli N, Florio T, Yuspa SH, Mazzanti M. Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2015;1848:2523–31. doi:10.1016/j.bbamem.2014.12.012.
- [24] Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, Yoshitomi I, Kawasaki G, Ikeda H, et al. Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41:1195–200.

doi:10.1016/j.ijom.2012.07.011.

- [25] Jardim JF, Francisco ALN, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44:23–8. doi:10.1016/j.ijom.2014.10.006.
- [26] Jones HB, Sykes A, Bayman N, Sloan P, Swindell R, Patel M, et al. The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:10–5. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.03.009.
- [27] Kim JM, Kim TY, Kim WB, Gong G, Kim SC, Hong SJ, et al. Lymphovascular invasion is associated with lateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116:2081–5.
- [28] Close LG, Burns DK, Reisch J, Schaefer SD. Microvascular Invasion in Cancer of the Oral Cavity and Oropharynx. *Arch Otolaryngol Neck Surg* 1987;113:1191–5. doi:10.1001/archotol.1987.01860110057008.
- [29] Michikawa C, Uzawa N, Kayamori K, Sonoda I, Ohyama Y, Okada N, et al. Clinical significance of lymphatic and blood vessel invasion in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2012;48:320–4. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.11.014.
- [30] Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, Yamada S, Naruse T, Sakamoto Y, et al. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44:543–8. doi:10.1016/j.ijom.2015.01.018.
- [31] Huber GF, Albinger-Hegy A, Soltermann A, Roessle M, Graf N, Haerle SK, et al. Expression patterns of Bmi-1 and p16 significantly correlate with overall, disease-specific, and recurrence-free survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2011;117:4659–70. doi:10.1002/cncr.26100.
- [32] Shi Z, Liu Y, Johnson JJ, Stack MS. Urinary-type plasminogen activator receptor (uPAR) modulates oral cancer cell behavior with alteration in

- p130cas. *Mol Cell Biochem* 2011;357:151–61. doi:10.1007/s11010-011-0885-3.
- [33] Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer* 2016;8:25–42. doi:10.4137/BIC.S38394.
- [34] Kudryavtseva A V, Lipatova A V, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, et al. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:53959–83. doi:10.18632/oncotarget.9796.
- [35] Blatt S, Voelxen N, Sagheb K, Pabst AM, Walenta S, Schroeder T, et al. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig* 2016;20:2097–104. doi:10.1007/s00784-015-1699-6.
- [36] Krüger M, Amort J, Wilgenbus P, Helmstädter JP, Grechowa I, Ebert J, et al. The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/ β -catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget* 2016;7:51082–95. doi:10.18632/oncotarget.9013.
- [37] Krüger M, Pabst AM, Al-Nawas B, Horke S, Moergel M. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:1757–66. doi:10.1007/s00432-015-1941-2.
- [38] Safi A-F, Nickenig H-J, Rothamel D, Zirk M, Thiele O, Grandoch A, et al. Expression of ezrin in oral squamous cell carcinoma: Prognostic impact and clinicopathological correlations. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2015;43:1899–905. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.08.011.
- [39] Dursun H, Bilici M, Uyanik A, Okcu N, Akyüz M. Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels in Erythrocytes of Patients with Oesophageal and Gastric Cancer. *J Int Med Res* 2006;34:193–9. doi:10.1177/147323000603400209.
- [40] Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and

- metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* 2016;148:183–93. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.
- [41] Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress- activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002;3:420–5. doi:10.1093/embo-reports/kvf094.
- [42] Hornsveld M, Dansen TB. The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxid Redox Signal* 2016;25:300–25. doi:10.1089/ars.2015.6580.
- [43] Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The Redox Protein Thioredoxin-1 (Trx-1) Increases Hypoxia-inducible Factor 1 α Protein Expression. *Cancer Res* 2002;62:5089–5095.
- [44] Kim WJ, Cho H, Lee S-W, Kim Y-J, Kim K-W. Antisense-thioredoxin inhibits angiogenesis via pVHL-mediated hypoxia-inducible factor-1 α degradation. *Int J Oncol* 2005;26:1049–52.
- [45] Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal- regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596–2606. doi:10.1093/emboj/17.9.2596.
- [46] Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Futur Oncol* 2014;10:1215–37. doi:10.2217/fon.14.60.
- [47] Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR. The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon? *Antioxid Redox Signal* 2005;7:367–84. doi:10.1089/ars.2005.7.367.
- [48] Yuzefovych L V, Kahn AG, Schuler MA, Eide L, Arora R, Wilson GL, et al. Mitochondrial DNA Repair through OGG1 Activity Attenuates Breast Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Res* 2016;76:30–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0692.
- [49] Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Fukushima S, et al. Progression of hepatic adenoma to carcinoma in Ogg1 mutant mice

- induced by phenobarbital. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:16 pages. doi:10.1155/2017/8541064.
- [50] Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. *Oral Oncol* 2007;43:894–7. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.10.013.
- [51] Chang T-S, Chang C-M, Ho H-C, Su Y-C, Chen L-F, Chou P, et al. Impact of Young Age on the Prognosis for Oral Cancer: A Population-Based Study in Taiwan. *PLoS One* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0075855.
- [52] Blanchard P, Belkhir F, Temam S, El Khoury C, De Felice F, Casiraghi O, et al. Outcomes and prognostic factors for squamous cell carcinoma of the oral tongue in young adults: a single-institution case-matched analysis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2017;274:1683–90. doi:10.1007/s00405-016-4419-1.
- [53] Li Y, Mao Y, Zhang Y, Cai S, Chen G, Ding Y, et al. Alcohol drinking and upper aerodigestive tract cancer mortality: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2014;50:269–75. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.12.015.
- [54] International Agency for Research on Cancer (IARC). Section 2.2. Cancer of the oral cavity and pharynx. In: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Consumption and Ethyl-carbamate. Lyon, France: IARC Press; 2010:237-329.
- [55] Nelson DE, Jarman DW, Rehm J, Greenfield TK, Rey G, Kerr WC, et al. Alcohol-Attributable Cancer Deaths and Years of Potential Life Lost in the United States. *Am J Public Health* 2013;103:641–8. doi:10.2105/AJPH.2012.301199.
- [56] Praud D, Rota M, Rehm J, Shield K, Zatoński W, Hashibe M, et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *Int J Cancer* 2016;138:1380–7. doi:10.1002/ijc.29890.

5.0 CONCLUSÃO GERAL

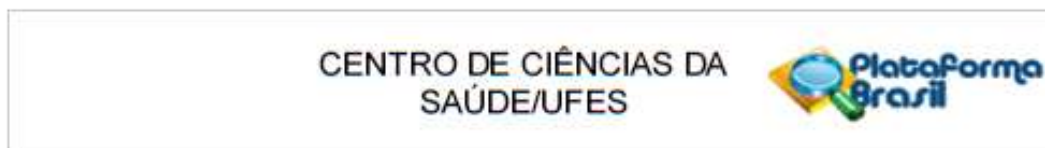
O estudo apresenta a avaliação inédita da caracterização dos elementos químicos presentes nos tumores pela técnica de μ XRF, baseada na radiação Síncrotron, não relatada na literatura para cancer de cabeça e pescoço e com resultados de associação da presença dos elementos com o hábito tabagista e com características prognósticas.

Alem disso, os resultados reforçam a influência do hábito tabagista na expressão de proteínas envolvidas na via de estresse oxidativo (SOD-1 e Trx) e reparo do DNA (OGG1/2). O trabalho traz também aspectos mais consagrados na literatura e na prática clínica, como a associação entre o uso do álcool e idade como fatores prognósticos, além de ressaltar as tradicionais avaliações histopatológicas de invasão perineural e vascular.

Nossos achados mostram que novos marcadores devem ser validados e podem ser adicionados aos parâmetros usuais da clínica e da patologia, como a expressão de proteínas da via de estresse oxidativo e reparo, bem como sua associação com o tamanho tumoral e fator de proteção à recidiva. Somado a isso, os achados de caracterização quanto à presença de elementos abrem perspectivas para melhor entendimento da biologia tumoral e como fatores prognósticos, já que a presença do cromo e cloro estiveram relacionados à recidiva.

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;

<p>Endereço: Av. Marechal Campos 1468</p>		<p>CEP: 29.040-091</p>
<p>Bairro: S/N</p>		
<p>UF: ES Município: VITORIA</p>		
<p>Telefone: (27)3335-7211</p>		<p>E-mail: cep@ccs.ufes.br</p>

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.350.363

-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_PROJETO_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

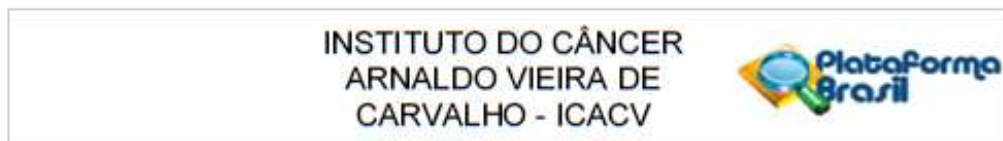
UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@ccs.ufes.br

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



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 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. 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

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

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@doutorarnaldo.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	reguliorrepositorio.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 Aruá, 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: cesp@doutorarnaldo.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 Arco, 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 2. Comprovante de submissão do artigo 1

23/04/2019 Email – Arícia Leone – Outlook

Outlook Pesquisar S ? AL

+ Nova mensagem Responder Excluir Arquivo Morto Lixo Eletrônico ... ↑ ↓ ×

Favoritos

Caixa de En... 2230
Adicionar aos favor...

Pastas

Caixa de Ent... 2230

Lixo Eletrônico 73

Rascunhos

Itens Enviados

Scheduled

Itens Excluídos 34

Arquivo Morto

Conversation Hist...

Nova pasta

Fwd: 5651620: Acknowledging Receipt

AA Anderson Barros Archanjo <andersonarchanjo@gmail.com> ↶ ↷ → ...

om >
Ter, 23/04/2019 13:57
Você

----- Forwarded message -----
De: Journal of Oncology <salma.sayed@hindawi.com>
Date: qui, 17 de jan de 2019 às 13:03
Subject: 5651620: Acknowledging Receipt
To: <andersonarchanjo@gmail.com>
Cc: <salma.sayed@hindawi.com>, <aricialeone@hotmail.com>, <suzannymendes@gmail.com>, <rps_mk@hotmail.com>, <rafaelcicco@uol.com.br>, <mayaraifez@gmail.com>, <alineborçoi@gmail.com>, <uliasassis1@hotmail.com>, <lucas_lmbio@hotmail.com>, <gabi-1989@hotmail.com>, <saito@icb.usp.br>, <etkimura@usp.br>, <brasilino.heliopolis@gmail.com>, <fadnunes@usp.br>, <etajara@hotmail.com>, <mal_santos@yahoo.com.br>, <brenovalentim@gmail.com>, <leotrivilin@gmail.com>, <christieste@yahoo.it>, <adriana.biomol@gmail.com>

Dear Dr. Archanjo,

The Research Article titled "Elemental characterization in squamous cell carcinoma of the oral cavity and its relationship with prognosis and survival," by Anderson Barros Archanjo, Arícia Assis, Suzanny Mendes, Rafael Souza, Rafael Cicco, Mayara Oliveira, Aline Borçoi, Júlia Pinheiro, Lucas Maia, Gabriela Peterle, Kelly Saito, Edna Teruko Kimura, Marcos Brasilino De Carvalho, Fabio D. Nunes, Eloiza Tajara, Marcelo dos Santos, Breno V. Valentim Nogueira, Leonardo Oliveira Trivilin, Christiano Pinheiro and Adriana Álvares-da-Silva has been received and assigned the number 5651620.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Oncology.

Best regards,

--

Salma Sayed
Editorial Office
Hindawi
<http://www.hindawi.com>

ANEXO 3. Comprovante de submissão do artigo 2

Oncology

Elsevier Editorial System(tm) for Oral

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: CHLORINE AND CHROMIUM ELEMENTS AND PROTEINS OF OXIDATIVE STRESS AND DNA REPAIR PATHWAYS ARE RELATED TO TUMOR AGGRESIVENESS AND PROGNOSIS OF PATIENTS WITH ORAL CANCER.

Article Type: Original Research Article

Section/Category: Basic

Keywords: metal trace; oxidative damage; repair enzymes; squamous cells cancer.

Corresponding Author: Mrs. Mayara Mota de Oliveira, M.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Espirito Santo

First Author: Aricia L Assis

Order of Authors: Aricia L Assis; Anderson B Archanjo; Suzanny O MENDES; Rafael P Souza; Rafael Cicco; Mayara Mota de Oliveira, M.D; JOAQUIM G SANTOS; ALINE R BORÇOI; IVANA A MORENO; LUCAS L MAIA; Gabriela T PETERLE; Juliana Dalbó; Kelly C SAITO; Edna T Kimura; Marcos B CARALHO; Fábio D NUNES; Eloiza Tajara; MARCELO SANTOS; Leonardo O Trivilin; Christiano J Pinheiro; Adriana M Álvares-da-Silva; Breno Valentim V Nogueira

Abstract: Objectives: The purpose of this study was to analyze the association of trace element and protein expression of repair and oxidative stress pathways with tumor aggressiveness and prognostic in patients with oral cavity tumors. Methods: For this, Elemental characterization by μ -XRF was verified, as well as clinical characteristics and expression of SOD-1, Ref-1, OGG1 / 2 and TRX proteins. Results: Chlorine and chromium elements were related to tumor recurrence. Perineural and vascular invasion were important indicators for aggression and tumor prognosis. Expression of SOD-1, Trx and Ref-1 showed a prognostic relationship with tumor growth. Alcoholic habit and vascular invasion had an impact on disease-free and disease-specific survival. Conclusion: Data lead to a better understanding of tumor signaling pathways and their relationship to prognosis of oral cancer.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:

No data was used for the research described in the article