



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

**Ação da nicotina na indução da expressão dos genes *PIK3CA*,  
*AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT1* e *CA9* em linhagens celulares SCC9 e  
DOK**

JOAQUIM GASPARINI DOS SANTOS

VITÓRIA/ES

2021



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

**Ação da nicotina na indução da expressão dos genes *PIK3CA*,  
*AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT1* e *CA9* em linhagens celulares SCC9 e  
DOK**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e à Rede Nordeste de Biotecnologia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

Coorientador: Fabio Daumas Nunes

VITÓRIA/ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S237a Santos, Joaquim Gasparini dos, 1990-  
Ação da nicotina na indução da expressão dos genes PIK3CA,  
AKT1, HIF-1?, GLUT1 e CA9 em linhagens celulares SCC9 e  
DOK / Joaquim Gasparini dos Santos. - 2021.  
72 f. : il.

Orientadora: Adriana Madeira Álvares da Silva.  
Coorientador: Fabio Daumas Nunes.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Nicotina. 3. Cultura  
de células. 4. Expressão gênica. I. Silva, Adriana Madeira  
Álvares da. II. Nunes, Fabio Daumas. III. Universidade Federal  
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a essa força maior que nos rege e que proporciona uma nova oportunidade de reescrever a nossa história a cada novo abrir de olhos.

Agradeço do fundo meu coração, do mais profundo canto do meu interior a aqueles que cederam metade de si para gerar esse fenótipo que sou hoje, a você minha mãe Rosângela e a meu pai Nilton.

Ao apoio incondicional daqueles ao qual compartilho parte da minha composição genética, meu irmão Thiago pelos ensinamentos sobre mundo e minha irmã Karla pelos ensinamentos científicos, além de ter doado parte do seu conhecimento durante o processo de confecção e correção da minha tese.

A minha companheira de caminhada terrena, esposa e médica veterinária particular Ana Carolina do Nascimento Oliveira, pela força, amor, dedicação e principalmente paciência com esse ser tão mutável, e por sempre acreditar e depositar todo seu amor. Amo ti.

A minha orientadora Profa. Dr. Adriana Madeira Álvares da Silva, por ser essa pessoa especial que emana uma luz de positividade, e pelos ensinamentos durante toda essa longa jornada compartilhada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, pela sua atenção e por ser sempre solícito, carismático e atencioso aos atender quando precisava. Saiba que as tecnologias tentaram conspirar contra a confecção dessa tese, mas não conseguiram.

Aos companheiros da terra da garoa Mayara Mota de Oliveira e Anderson Barros Archanjo pela vivência e que também por doaram parte dos seus conhecimentos na correção e escrita.

Ao grupo de *terapia toque no corcunda* (Aline Borçoi, Suzanny Mendes e Ivana Moreno), pela amizade, pelo porto seguro e por estarem sempre prontas para ouvir e aconselhar os lamentos desse ser humaninho, além de serem responsáveis por confeccionar as melhores figuras e momentos de descontração da minha vida. Grato OK.

Agradeço a todos os membros da banca, pelo aceite e por cederem parte dos seus conhecimentos na melhora da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO da Universidade Federal do Espírito Santo.

Por fim agradeço aos órgãos de fomento CAPES e FAPES, que mesmo com pouco faz muito pela ciência brasileira.

*“Tudo, tudo, tudo, tudo que nós tem é nós  
Tudo, tudo, absolutamente tudo que nós tem é  
Tudo que nós tem é isso, uns ao outro  
Tudo o que nós tem é uns ao outro, tudo”*

*(Emicida – Principia – AmarElo )*

## RESUMO

A nicotina é o principal componente presente nos produtos derivados do tabaco com capacidade de ativar vias ligadas à tumorigênese, crescimento do tumor, mudanças metabólicas e resistência terapêutica em diversos tipos de câncer, principalmente no câncer de cavidade oral, mas pouco ainda se sabe sobre os efeitos da nicotina sobre lesões com potencial malignizantes presentes na cavidade oral. Neste trabalho procuramos compreender os efeitos da nicotina sobre a expressão dos genes ligados a via de progressão tumoral, como *PIK3CA*, *AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT1* e *CA9*, em linhagens celulares de DOK e SCC9. Para isso as linhagens celulares foram submetidas a ensaio de viabilidade celular por SRB, de migração por teste de ferida e análise por RT-qPCR para expressão dos genes de interesse. A nicotina demonstrou a capacidade de aumentar a viabilidade celular de SCC9 em todas as concentrações e no tempo de 8 horas em relação ao controle, o mesmo não foi observado no ensaio de ferida. Em células DOK, apenas a concentração de 10  $\mu$ M, no tempo de 8 horas, foi capaz de aumentar a migração celular em relação ao controle. A capacidade da nicotina em aumentar a expressão gênica em SCC9 foi mais evidente no tempo de 24 horas e, apenas o gene *PIK3CA* teve uma maior expressão no tempo de 8 horas. Em DOK pode-se observar que a expressão dos genes em questão ficou restrita ao tempo de 8 horas e a concentração de 10  $\mu$ M. Portanto há uma relação entre a exposição à nicotina com o aumento da expressão dos genes nas linhagens SCC9 e DOK ao qual o uso de produtos com altas concentrações de nicotina pode contribuir com o aumento do risco de malignização de regiões com lesões com potencial malignizante presentes na cavidade oral.

## ABSTRACT

Nicotine is the main component present in tobacco products capable of activating pathways linked to tumorigenesis, tumor growth, metabolic changes and therapeutic resistance in several types of cancer, mainly in oral cavity cancer, but little is known about the effects of nicotine on lesions with malignant potential present in the oral cavity. In this work we seek to understand the effects of nicotine on the expression of genes linked to the pathway of tumor progression, such as PIK3CA, AKT1, HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 and CA9, in cell lines of DOK and SCC9. For that, the cell lines were submitted to cell viability assay by SRB, migration by wound test and analysis by RT-qPCR for expression of the genes of interest. Nicotine demonstrated the ability to increase the cell viability of SCC9 in all concentrations and in the time of 8 hours in relation to the control, the same was not observed in the wound test. In DOK cells, only the concentration of 10  $\mu$ M, in the time of 8 hours, was able to increase the cellular migration in relation to the control. The ability of nicotine to increase gene expression in SCC9 was more evident at 24 hours and only the PIK3CA gene had a higher expression at 8 hours. In DOK it can be seen that the expression of the genes in question was restricted to the time of 8 hours and the concentration of 10  $\mu$ M. Therefore, there is a relationship between exposure to nicotine and increased expression of genes in the SCC9 and DOK strains, to which the use of products with high concentrations of nicotine may contribute to the increased risk of malignization in regions with lesions with malignant potential present in the oral cavity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das regiões da cavidade oral que podem ser acometidos por Câncer de Cavidade Oral (CCO). .....	18
Figura 2. Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) heteroméricos e homoméricos.....	21
Figura 3. Vias de proliferação, migração e sobrevivência de células tumorais, ativadas por sinalização iônica e não iônica através da ligação de nicotina a receptores nicotínico de acetilcolina (nAChR).....	22
Figura 4. Representação esquemática da proteína de <i>PIK3CA</i> e de sua subunidade catalítica <i>p110<math>\alpha</math></i> e da subunidade regulatória <i>p85<math>\alpha</math></i> e suas regiões de interação.....	24
Figura 5. Representação esquemática da proteína de <i>AKT</i> . .....	25
Figura 6. Processo de ativação e regulação da via de <i>PI3K/AKT</i> através de receptores com atividade <i>pTyr</i> e seus efeitos sobre ativação de processos celulares.....	26
Figura 7. Representação esquemática da proteína de <i>HIF1<math>\alpha</math></i> e $\beta$ . .....	27
Figura 8. Representação esquemática da regulação celular de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em situação de hipóxia, pseudohipóxia e normóxia.....	28
Figura 9. Efeito Warburg em células tumorais. ....	31
Figura 10. Efeito da nicotina sobre a viabilidade celular de <i>SCC9</i> (a) e <i>DOK</i> (b), analisada por <i>SRB</i> nos tempos de 8 e 24 horas.....	37
Figura 11. Efeito das concentrações de nicotina sobre a migração celular de <i>SCC9</i> .. .....	38
Figura 12. Efeito das concentrações de nicotina sobre a migração celular de <i>DOK</i> . .....	39
Figura 13. Expressão relativa de <i>PIK3CA</i> em <i>SCC9</i> nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina .....	41
Figura 14. Expressão relativa de <i>PIK3CA</i> em <i>DOK</i> nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	42

Figura 15. Expressão relativa de <i>AKT1</i> em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	43
Figura 16. Expressão relativa de <i>AKT1</i> em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	44
Figura 17. Expressão relativa de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	45
Figura 18. Expressão relativa de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	46
Figura 19. Expressão relativa de <i>GLUT1</i> em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	47
Figura 20. Expressão relativa de <i>GLUT1</i> em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	48
Figura 21. Expressão relativa de <i>Ca9</i> em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	49
Figura 22. Expressão relativa de <i>Ca9</i> em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. ....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers para qPCR.....	36
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Akt** – v-Akt Teratoma oncogene viral de Murine

**Ca<sup>2+</sup>** - Íon Cálcio

**Ca9** – Anidrase Carbônica 9

**CCO** – Câncer de cavidade oral

**CECO** – Carcinoma epidemoide de cavidade oral

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**ERO** – Espécie Restiva de Oxigenio

**Glut1** – Transportador de glicose tipo 1

**HCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato

**HIF-1 $\alpha$**  – Fator de indução de hipóxia -1 alpha

**HPV** – Papiloma vírus Humano

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**LDH** - Lactato Desidrogenase

**mRNA** – RNA mensageiro (do inglês messenger RNA)

**Na<sup>+</sup>** - Íon sódio

**nAChR** – Receptor nicotínico de acetilcolina

**pAkt** – fosfato específico Akt

**PDK1** - piruvato desidrogenase quinase 1

**PI3K** – Fosfatidilinositol-3-quinase

**PIK3CA** - Fosfatidilinositol-3-quinase alfa

**PtdIns-3,4-P<sub>2</sub>** - Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

**PtdIns-3,4-P<sub>3</sub>** - Fosfatidilinositol-3,4-trifosfato

**Ser** – Serina

**shRNA** – Short Haripin RNA

**siRNA** – RNA pequeno de interferência (do inglês small interfering RNA)

**SRB** - Suforodamina-B

**TCA** - Ácido tricloroacético

**Thr** – Treonina

**Tyr** – Tirosina

**VHL** – Von Hippel-Lindau

**VTA** – Área tegumentar ventral

**Zn<sup>2+</sup>** - Íon zinco

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Revisão de literatura.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Câncer de Cavidade Oral.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. A ação da nicotina no organismo e em células tumorais.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Estrutura modular de PIK3CA e AKT1 e sua via de ativação .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Via de HIF-1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Metodologia .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Cultura celular .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. Ensaio de Viabilidade Celular .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Ensaio de cicatrização de ferida .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4. Extração de RNA e Teste de integridade.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5. Tratamento e Síntese de cDNA.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6. PCR em tempo real.....</b>	<b>35</b>
<b>4.7. Análise Estatística.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1. Teste de viabilidade das linhagens celulares de SCC9 e DOK expostas a diferentes concentrações de nicotina.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2. Efeito de diferentes concentrações de nicotina na migração celular das linhagens de SCC9 e DOK .....</b>	<b>38</b>
<b>5.3. Análise da expressão gênica em SCC9 e DOK expostas a diferentes concentrações de nicotina .....</b>	<b>40</b>

5.3.1.	<i>PIK3CA</i> .....	40
5.3.2.	<i>AKT1</i> .....	42
5.3.3.	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i> .....	44
5.3.4.	<i>Glut1</i> .....	46
5.3.5.	<i>Ca9</i> .....	49
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Referências</b> .....	<b>58</b>
	<b>Anexos</b> .....	<b>59</b>

## 1. Introdução

O hábito tabagista foi considerado símbolo de status e glamour na sociedade por um longo período, entretanto, foi rebaixado pelos principais órgãos de saúde mundial, para uma das principais causas de morte evitável em todo o mundo (MUSK; DE KLERK, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Tal fato se deve a presença de mais de 7.000 substâncias, das quais 70 são classificadas como potencialmente carcinogênicas, com capacidade de causar desequilíbrio na homeostase do organismo do usuário, contribuindo assim para o desenvolvimento de diversos tipos de doenças, dentre elas o câncer de cavidade oral, pulmão, mamas, bexiga, pâncreas, estômago, dentre outros tipos (BENOWITZ, 2010; MENDEL et al., 2018; CHATURVEDI et al., 2019; SZYFTER et al., 2019).

A nicotina é o principal alcaloide natural não carcinogênico, presente em altas concentrações nos produtos derivados do tabaco, responsável pela dependência dos usuários. Seu uso é amplamente difundido no tratamento de reposição de nicotina em indivíduos que desejam abandonar o hábito tabagista (DE BIASI; DANI, 2011; WADGAVE; NAGESH, 2016). Nos últimos anos, houve um aumento da difusão do uso de sistemas eletrônicos de entrega de nicotina (cigarros eletrônicos) como alternativa de substituição ao uso do cigarro convencional e para terapia de reposição de nicotina e abandono do cigarro (SELYA et al., 2018).

Dados demonstram que o consumo dos cigarros eletrônicos pelo público mais jovem vem crescendo nos últimos anos, isso se deve a propaganda positiva em torno desse dispositivo em substituição ao cigarro convencional e seus malefícios (WILLIAMS; LI; TALBOT, 2019). Estudos demonstram que os cigarros eletrônicos possuem um maior potencial de causar dependência aos usuários quando comparado ao cigarro convencional, sendo assim uma porta de migração para o uso dos cigarros convencionais (SELYA et al., 2018; WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018; JANKOWSKI et al., 2019). Outro ponto importante a se observa, é que a maioria dos usuários do cigarro eletrônico é usuária dupla, ou seja, fazem o uso em conjunto do cigarro convencional e eletrônico (MARTÍNEZ et al., 2020).



Outro fato importante a ser observado é que indivíduos fumantes possuem uma maior pré-disposição para o desenvolvimento em sua cavidade oral de lesões com potencial malignizantes, como por exemplo, as displasias de epitélio oral, que são caracterizadas pelo crescimento anormal das células do epitélio oral (RANGANATHAN K, 2019). Dentre as displasias do epitélio oral, pode-se destacar a leucoplasia oral, um tipo lesão com incidência seis vezes maior em fumantes do que em não fumantes, ao qual possui um risco aumentado de duas vezes em se transformar em câncer de cavidade oral (WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018; QI et al., 2019; RANGANATHAN K, 2019). É importante salientar, que mesmo com o avanço nos estudos do câncer de cavidade oral (CCO), ainda não foram encontrados marcadores moleculares que possam ser utilizados para auxiliar o diagnóstico preciso nos estágios iniciais da doença (ZAINAL et al., 2019).

Na literatura, observa-se uma melhor compreensão dos efeitos negativos gerados pela exposição à nicotina em células de câncer de pulmão, ao qual relacionam a exposição como aumento da progressão tumoral e quimiorresistência, favorecendo um pior prognóstico para os pacientes (ZHANG et al., 2007a; NISHIOKA et al., 2014; WANG et al., 2018; YOUNG; SCOTT, 2020). Curiosamente, pouco ainda é conhecido sobre os reais efeitos da exposição da cavidade oral à nicotina. No entanto, alguns estudos demonstram que a exposição de células de câncer de cavidade oral à nicotina é capaz de alterar expressão de genes ligados a evasão da apoptose, aumento da proliferação, migração e quimiorresistência. (XU et al., 2007; MURUGAN et al., 2008; NAKASHIRO et al., 2015; WANG et al., 2017b; WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018; NISHIOKA et al., 2019). Desta maneira, compreender os malefícios que a nicotina pode causar a saúde oral dos usuários de tabaco e cigarro eletrônico é de suma importância.

Apesar de não ser considerado um agente diretamente carcinogênico, estudos demonstram que a nicotina tem efeito em diversas proteínas de sinalização em células neoplásicas, especialmente na ativação das proteínas ligadas a via PI3K/AKT, que é uma via crítica constantemente ativada em diversos tipos de câncer, que contribui diretamente para o desenvolvimento do câncer e a ativação desta via está diretamente associada à tumorigênese, crescimento do tumor, mudanças metabólicas e resistência terapêutica (BADER et al., 2005; MELOCHE; POUYSSÉGUR, 2007; CHEN et al., 2010).

A ativação da via de PI3K/AKT em células neoplásicas, possui uma capacidade notável de realizar mudanças em seu metabolismo. Essas mudanças ocorrem no intuito de aumentar suas chances de sucesso de sobrevivência, proliferação e de realizar metástase (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2020). Devido à rápida proliferação das células cancerígenas e aumento da demanda por energia para suportar a sua proliferação, grande parte do piruvato proveniente da glicólise aeróbica é desviado para via do lactato, ao invés de entrar no ciclo oxidativo. Mesmo em condições de normóxia, esse desvio de metabolismo é uma forma rápida de obtenção de energia pela célula e para geração de metabolismo que supra vias anabólicas necessárias para sua rápida proliferação celular. Essa mudança metabólica em células tumorais foi descrita pela primeira vez por Otto Warburg em 1920, sendo assim denominada Efeito Warburg (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011; HAYASHI et al., 2019).

Sob o ponto de vista molecular, a mudança do metabolismo da glicose é favorecida pelo aumento da transcrição e tradução da proteína *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), bem como a formação e estabilização do complexo transcricional HIF-1 $\alpha$ / $\beta$  (SEMENZA, 2007a; HAYASHI et al., 2019). O complexo transcricional de HIF-1 é responsável pelo aumento da expressão do transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1) e das enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato desidrogenase quinase (PDK1) e anidrase carbônica 9 (Ca9). GLUT-1 favorece o aumento da captação de glicose pela célula; PDK1 tem o papel de limitar a entrada de piruvato no ciclo de Krebs; LDH é responsável por desviar a rota de degradação do piruvato para via de lactato; Ca9 é fundamental na manutenção do pH intracelular de células neoplásicas (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011; SEMENZA, 2012; HOXHAIJ; MANNING, 2020).

Tendo em vista a intrínseca participação da nicotina na ativação da via de PI3K/AKT, bem como de genes relacionados à via de mudança de metabolismo como *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT-1* e *Ca9* diversas tipos de câncer, ao qual, favorecem a alteração de metabólitos, sobrevivência, proliferação e inibição da apoptose de células cancerígenas. A investigação dos efeitos da nicotina sobre a expressão dos genes citados teve início durante o meu mestrado, ao qual foi realizada a exposição das linhagens SCC9 e DOK a altas concentrações de nicotina. No doutorado procuramos utilizar concentrações mais preconizadas na literatura com objetivo analisar a influência de menores concentrações de

nicotina na expressão dos genes *PIK3CA* e *AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT-1* e *Ca9*

Até o momento pouco se sabe a respeito da exposição à nicotina em células com potencial malignizante, além disso, é escasso na literatura estudos comparativos entre os níveis de mRNA dos genes reguladores de crescimento e linhagens celulares malignas e com potencial malignizante após exposição à nicotina. Portanto entender e definir determinantes relacionados ao efeito da nicotina com a progressão neoplásica é de extrema necessidade para o avanço de novos estudos em relação à carcinogênese oral. Vale ressaltar, que não foram encontrados na literatura estudos que relacionem o efeito da exposição à nicotina sobre a expressão dos genes *PIK3CA*, *AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT-1* e *Ca9* em linhagens de lesões pré-malignas.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da exposição à nicotina em concentrações em 0, 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  no tempo de 8 e 24 horas, na expressão gênica de *PIK3CA*, *AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT-1* e *Ca9* em cultivo celular de DOK e SCC9.

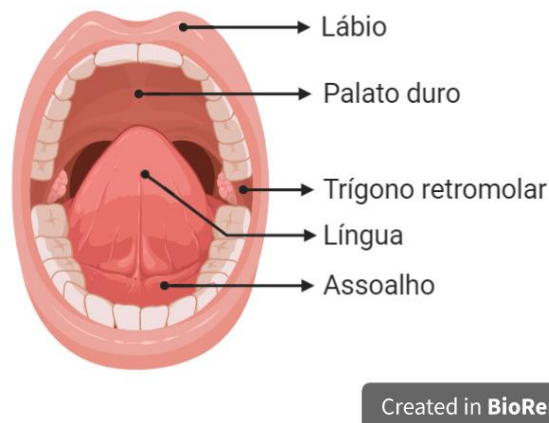
### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito das concentrações de 0, 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de nicotina sobre a viabilidade celular das linhagens DOK e SCC9 expostas pelo período de 8 e 24 horas, através do ensaio de Suforodamina-B (SRB);
- Avaliar o efeito das concentrações de 0, 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de nicotina sobre migração celular de DOK e SCC9 expostas pelo período de 8 e 24 horas, através do ensaio de ferida;
- Submeter as linhagens celulares DOK e SCC9 as concentrações de 0, 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de nicotina, nos tempos de 8 e 24 horas, para determinar a influência da nicotina na expressão dos genes de *PIK3CA*, *AKT1*, *HIF-1 $\alpha$* , *GLUT-1* e *Ca9*.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1. Câncer de Cavidade Oral

O câncer de cavidade oral (CCO) é uma neoplasia maligna agressiva de rápido crescimento, originado em regiões compreendidas pela face mucosa dos lábios, parte bucal da língua, assoalho bucal, trígono retromolar e palato duro (Figura 1). Dentre o CCO, o carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO), corresponde a 90% dos novos casos diagnosticados (CHOU et al., 2019).



**Figura 1.** Regiões da cavidade oral que podem ser acometidas por Câncer de Cavidade Oral (CCO). Created with BioRender.com

Segundo o último levantamento realizado pela *Global Cancer Statistic*, em todo o mundo, foram diagnosticados aproximadamente 358.864 indivíduos com CCO, sendo o número de mortes, em decorrência da doença, de aproximadamente 177.384 indivíduos (BRAY et al., 2018). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que para os anos de 2020-2022 são esperadas no Brasil aproximadamente 11.200 novos casos de CCO, dentre esses 4.010 virão a óbito (INCA, 2020).

As maiores taxas de incidência de CCO ainda são observadas em indivíduos que estão em situação maior de vulnerabilidade, ou seja, indivíduos com baixa renda e escolaridade, condição bucal precária e com maior dificuldade de acesso aos serviços básicos de saúde de qualidade. Portanto, todas essas características sociais irão refletir no estadiamento clínico do paciente, onde aproximadamente 50% dão entrada nas unidades de saúde com lesões sintomáticas de estágio avançado da doença (T3-T4) (ZAINAL et al.,

2019). Vale ressaltar que entre 50-60% dos pacientes diagnosticados com CCO terão uma taxa de sobrevida global e de controle locorregional estimados - após o tratamento – de aproximadamente cinco anos (CHOU et al., 2019).

Estudo realizado na Índia mostrou que o treinamento correto dos profissionais da saúde para realizarem uma ampla análise na cavidade oral de pacientes fumantes, reduziu em aproximadamente 35% o índice de mortalidade por CECO, devido à detecção precoce de lesões (SANKARANARAYANAN et al., 2005). Desta forma, torna-se crucial para preservação da vida e sucesso do tratamento, O diagnóstico do CCO em estágio inicial, o que reflete positivamente na diminuição dos índices de mortalidade, morbidade e do uso de cirurgias mutilatórias (VAN DER WAAL et al., 2011; CHATURVEDI et al., 2019). Além disso, sobreviventes de câncer de cabeça e pescoço tem a segunda maior taxa de suicídio (63,4 casos a cada 100.00 indivíduos) entre todos os tipos de câncer, devido ao comprometimento da qualidade de vida (JOHNSON et al., 2020).

É de sumo conhecimento que a exposição a alguns fatores de risco como infecção por Papiloma Vírus Humano (do inglês *Human Papilloma Virus* - HPV), uso de tabaco, o consumo excessivo de álcool, levam a um aumento das possibilidades de desenvolvimento de CCO. Nota-se que em 75% de todos os novos casos relatados, o uso concomitante de álcool e tabaco atuam como principais responsáveis pelo CCO. Além disso, observa-se que o risco de um fumante desenvolver câncer de cavidade oral é cinco vezes maior do que um indivíduo que nunca fumou (CRAMER et al., 2019).

### **3.2. A ação da nicotina no organismo e em células tumorais**

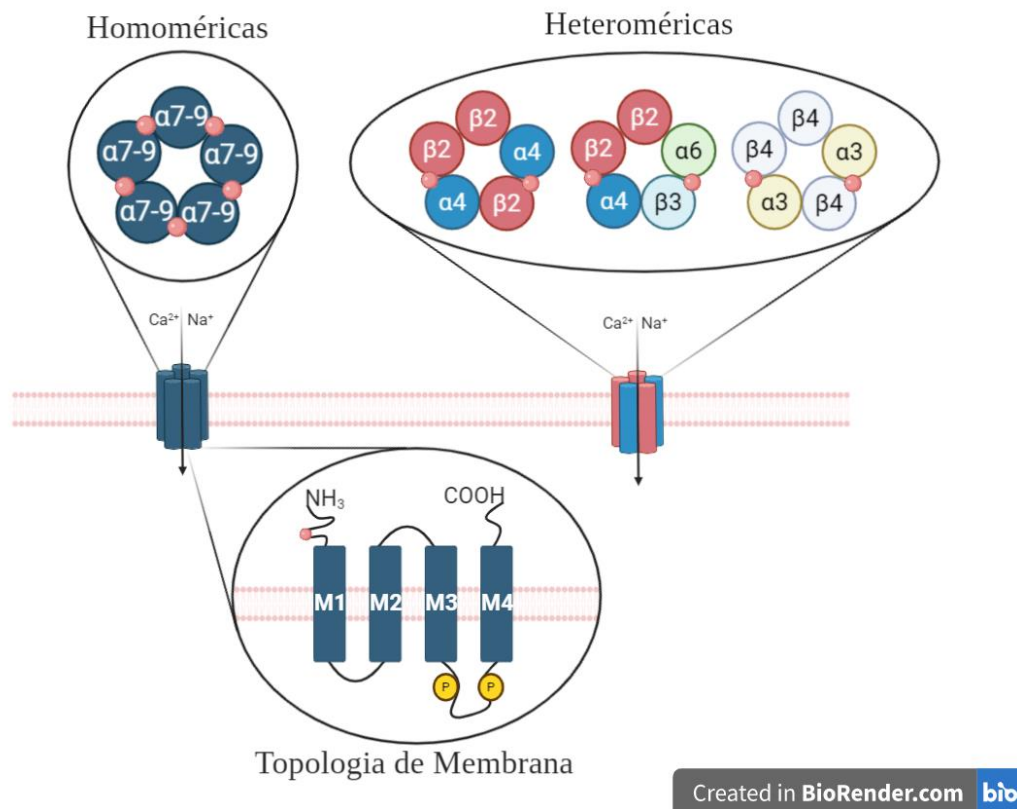
A nicotina é um dos principais alcaloides piridínicos encontrado em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Sintetizados principalmente nas raízes, os alcaloides, incluindo a nicotina, são transportados através do xilema e acumulados especialmente nas folhas, local mais susceptíveis ao ataque de herbívoros nas plantas (SHI; LI; ZHANG, 2006). Devido à sua interação com receptores de acetilcolina no sistema nervoso dos animais, a nicotina é extremamente tóxica à maioria dos herbívoros e por isso despertou interesse no seu uso como pesticida na agricultura (SCHMELTZ 1971).

A nicotina também é o principal alcaloide presente nos produtos derivados do

tabaco como cigarros, charutos, tabaco sem fumaça, tabaco para narguilé e a maioria dos cigarros eletrônicos. A absorção da nicotina pelo organismo irá depender do seu pH e estado de ionização; por exemplo, a nicotina encontrada no cigarro tem um pH alcalino e um estado não ionizado, sendo assim rapidamente absorvido pelo epitélio do pulmão e pela mucosa da cavidade oral (MUSK; DE KLERK, 2003; SANNER; GRIMSRUD, 2015).

A nicotina exerce seus efeitos através da alta afinidade de ligação aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) presentes na área tegmental ventral (VTA), localizado no mesencéfalo, levando à liberação de dopamina na área mesolímbica, no corpo estriado e no córtex pré-frontal e núcleo accumbens. Neurônios dopaminérgicos que liberam dopamina da VTA do mesencéfalo para o *shell* do núcleo accumbens, são essenciais no processo de recompensa induzido pela nicotina, pois essa região está ligada ao aprendizado por esforço, evitação de aversão e motivação (BENOWITZ, 2010; MATSUMOTO et al., 2016). Dessa forma, o uso repetitivo de nicotina leva a alterações na liberação de dopamina no núcleo accumbens, que está relacionado à plasticidade alterada do sistema nervoso central levando à dependência química do usuário (DE BIASI; DANI, 2011). Adicionalmente, devido a essa ação no cérebro, diversos produtos à base de nicotina podem ser utilizados para ajudar usuários a abandonar o hábito tabagista (MUSK; DE KLERK, 2003; BENOWITZ, 2010).

Os nAChR são canais iônicos dependentes de ligantes localizado na membrana plasmática de células neuronais e não neuronais, composto por cinco subunidade com um canal central que permite influxo de cátions, como  $Ca^{2+}$  e  $Na^{+}$  (GRASSI; FUCILE, 2020). Os nAChR podem ser compostos por 5 subunidades homoméricas ( $\alpha 7$  ou  $\alpha 9$ ) ou podem encontrados na combinação heteroméricas de duas subunidades alfa ( $\alpha 2, 3, 4, 5, 6$  e  $\alpha 10$ ) em conjunto com três subunidades beta ( $\beta 2, 3$  e  $4$ ), como por exemplo:  $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  (Figura 2). O local de ligação do neurotransmissor acetilcolina e da nicotina em nAChR, está localizado na subunidade  $\alpha$  em sua região amino terminal (CHANGEUX, 2018). Observa-se uma maior afinidade de ligação da nicotina a esses receptores, deslocando assim a ligação da acetilcolina. Cada subunidade de nAChRs é composta por quatro segmentos hidrofóbicos transmembrânicos (M1-4), onde o segmento M2 reveste a parte interna do poro catiônico e os segmentos M3 e 4 possuem uma alça de ligação com sítios de fosforilação para Ser/Tyr quinases (Figura 2) (SCHULLER, 2009; GRANDO, 2014).



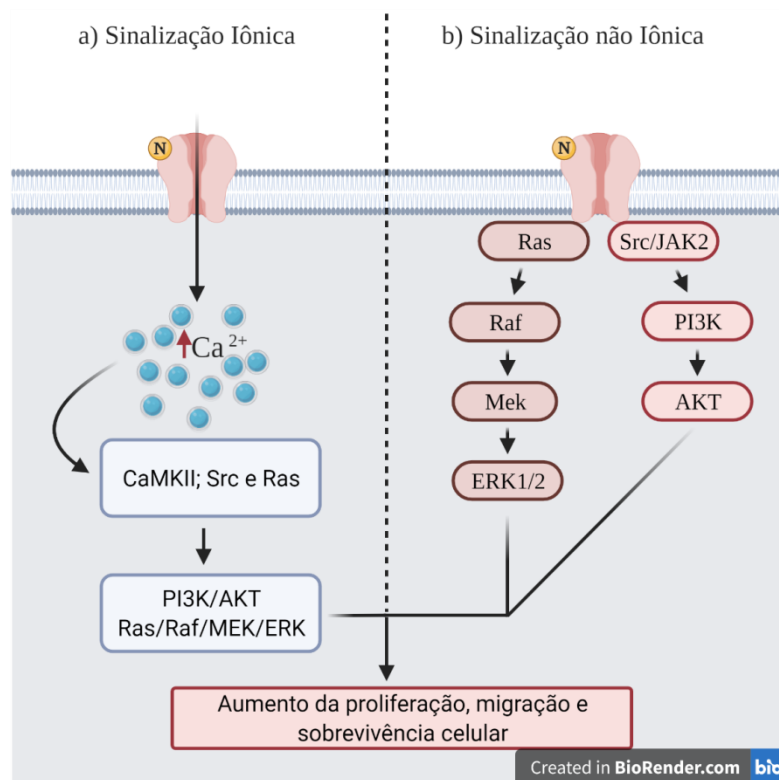
**Figura 2.** Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) heteroméricos e homoméricos. Cada subunidade dos nAChR é constituída por quatro domínios hidrofóbicos transmembrânicos (M1-4). Os sítios de ligação de acetilcolina e nicotina nas subunidades  $\alpha$  estão representados pelo círculo na cor rosa. **Created with BioRender.com**

A concentração de nicotina encontrada no organismo de usuários de produtos derivados do tabaco pode sofrer variações entre o plasma e a saliva dependendo do produto usado; no plasma essa concentração pode variar de 0.03  $\mu\text{M}$  a 0.5  $\mu\text{M}$  e na saliva de 0.6  $\mu\text{M}$  a 10 mM (WANG et al., 2017a). Mesmo não sendo considerada uma substância capaz de causar carcinogênese, a nicotina possui uma intrínseca participação nos processos de ativação de vias de crescimento tumoral, progressão celular, migração, angiogênese, evasão apoptótica e indução de metástase das células tumorais de câncer de cavidade oral, pulmão, rins e bexiga, estômago, pâncreas, vesícula biliar, fígado e cólon, devido à sua alta afinidade de ligação aos receptores nAChs não neuronais presentes nessas células (SCHULLER, 2009; MACHA et al., 2011; GRANDO, 2014).

A alta afinidade de ligação da nicotina aos receptores nAChR leva à ativação de vias de sinalização intracelular que favorecem a proliferação, sobrevivência e migração de células neoplásicas. A ativação das vias pode ocorrer através da sinalização iônica (Figura



3a) ou não iônica (Figura 3b) (GRANDO, 2014). Na sinalização iônica, a ligação entre nicotina e o receptor nAChR acarreta a abertura do canal central de íons, o que aumenta o influxo e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma; esse aumento da concentração é responsável pela ativação de proteínas de sinalização (CaMKII, SRC e Ras) que levam a ativação de vias PI3K/AKT e de Ras/Raf/Mek/ERK. Na sinalização não iônica, proteínas quinases de sinalização acopladas a nAChR (SRC, JAK2 e Ras) regulam a fosforilação e desfosforilação de cascata enzimática através da sinalização a jusante de nAChRs, o que leva também a uma ativação as vias de PI3K/AKT e Ras/Raf/Mek/ERK (Figura 3b) (FOCUS; SLOMINSKI, 2010; GRANDO, 2014).



**Figura 3.** Vias de proliferação, migração e sobrevivência de células tumorais, ativadas por sinalização iônica e não iônica através da ligação de nicotina a receptores nicotínico de acetilcolina (nAChR). **Created with BioRender.com**

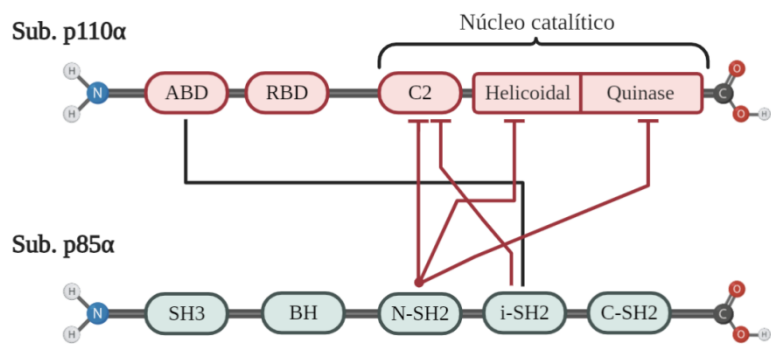
Estudos *in vitro* demonstraram relação direta entre a nicotina, aumento da expressão  $\alpha 7$ -nAChR e a resistência às drogas utilizadas no tratamento de CECO e câncer de pulmão. Tal fato é devido ao aumento da ativação das cascatas de sinalização de promoção do câncer, como PI3K/AKT, ERK1/2, HIF-1 $\alpha$  e fatores de crescimento como de

EGF. O uso de inibidor seletivo para  $\alpha 7$ -nAChR, como  $\alpha$ -Bungarotoxin, leva à diminuição dessas cascatas de sinalização e o aumento da sensibilidade das células às drogas (XU et al., 2007; ZHANG et al., 2007b; WANG et al., 2017b; NISHIOKA et al., 2019; SHIMIZU et al., 2019; CHENG et al., 2020; HSU et al., 2020). Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de inibir a atividade de  $\alpha 7$ -nAChR é visto como promissor no tratamento de tumores que possuem uma alta expressão de  $\alpha 7$ -nAChR.

### 3.3. Estrutura modular de PIK3CA e AKT1 e sua via de ativação

As PI3Ks são quinases lipídicas intracelulares expressas nas células humanas em três classes distintas (IA/B, II e III), com capacidade de fosforilar o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositóis, permitindo que estes sirvam como ligantes e reguladores funcionais de uma ampla gama de proteínas (BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019). Com uma expressão ubíqua, a classe IA das PI3Ks ( $PI3K\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ), são conhecidas pela sua capacidade de conversão de fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PtdIns-3,4- $P_2$ ) - presente na membrana das células - para fosfatidilinositol-3,4,5-tifosfato (PtdIns-3,4,5- $P_3$ ), um segundo mensageiro responsável por recrutar e ativar proteínas ligadas às vias anabólicas, crescimento e homeostase necessárias para o desenvolvimento normal das células do organismo (FRUMAN et al., 2017; MADSEN; VANHAESEBROECK, 2020).

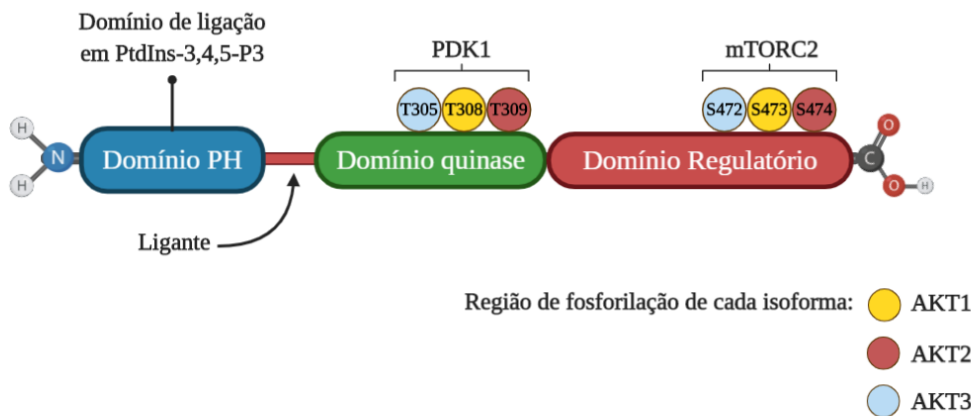
$PI3K\alpha$ , também conhecida como PIK3CA, possui uma estrutura modular formada por um heterodímero composto por uma subunidade regulatória p-85 $\alpha$  e uma subunidade catalítica p110 $\alpha$  (Figura 4)(BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019). A isoforma alfa é um dos principais oncogenes com mutação ou com expressão amplificada encontrado em tumores sólidos, onde esses fatores denotam um pior prognóstico para pacientes com câncer de cabeça e pescoço, colón, próstata e mama. Vale ressaltar que *PIK3CA* é o único oncogene frequentemente mutado em 14% dos tumores de cabeça e pescoço, além disso, a amplificação gênica de *PIK3CA* é encontrada em 16% desses tumores (AGELL et al., 2011; WANG et al., 2014; LAI; KILLINGSWORTH; LEE, 2015; ARAFEH; SAMUELS, 2019; KARUNAKARAN; MUNIYAN, 2020)



Created in BioRender.com bio

**Figura 4.** Representação esquemática da proteína de PIK3CA e de sua subunidade catalítica p110 $\alpha$  e da subunidade regulatória p85 $\alpha$  e suas regiões de interação. Linha preta indica a ligação entre ABD e i-SH2, o que confere a estabilidade a p110 $\alpha$ . Linha vermelha indica as ligações existente entre as duas subunidades que confere a atividade regulatória da subunidade catalítica p110 $\alpha$ . Essas ligações em vermelho são extintas a partir do momento que a subunidade regulatória se liga a um receptor com atividade de fosforilar tirosina (pTyr). **Created with BioRender.com**

AKT é uma classe de proteína Ser/Thr quinase AKT (também conhecida com PKB) que compreende três isoformas, que são expressas por diferentes genes. *AKT1* (*PKB $\alpha$* ) possui uma expressão ubíqua no organismo. *AKT2* (*PKB $\beta$* ) possui uma alta expressão em tecidos com maior sensibilidade à insulina, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Já *AKT3* (*PKB $\gamma$* ) tem uma maior expressão no cérebro e testículos. Mesmo com sua expressão em diferentes genes, a estrutura da proteína é semelhante entre as três isoformas, mudando apenas a posição de fosforilação (Figura 5) (FRANKE, 2008; MANNING; TOKER, 2017). Estudos têm demonstrado uma ligação entre o aumento da expressão de AKT1 e a progressão de CECO, devido a sua correlação com ativação de vias que favorecem a proliferação e sobrevivência celular (NAKASHIRO et al., 2015; ROY et al., 2019)

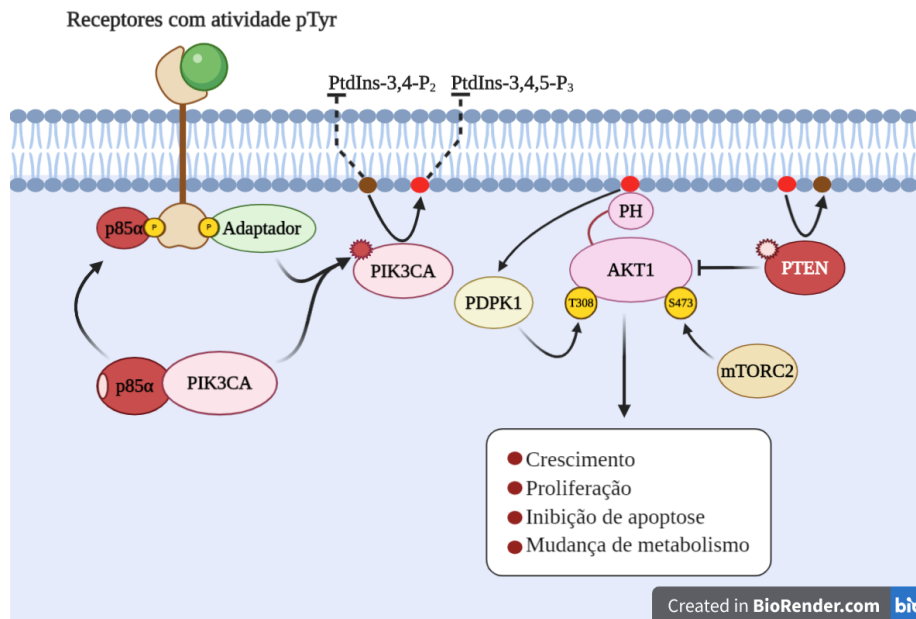


Created in BioRender.com

**Figura 5.** Representação esquemática da proteína de AKT. O domínio PH (Pleckstrin Homology) é responsável por ligar AKT em PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>, que foi convertido por PI3K. O domínio quinase e regulatório, serão fosforilados nas suas respectivas porções dependendo da isoforma de AKT, por PDK1 e mTORC2, ao qual levará a ativação de AKT. **Created with BioRender.com**

A ativação da via de PIK3CA/AKT1 (Figura6) é iniciada com a interação entre a subunidade regulatória e catalítica. Isso mantém a atividade enzimática de PIK3CA em um estado de inativação no citosol. No entanto, a ligação de fatores extracelulares à receptores específicos com atividade pTyr (tirosinas quinases, EGFR, receptor de insulina, nAChRs, entre outros) favorece a ancoragem da subunidade p-85 $\alpha$  e sua fosforilação, o que desencadeia a liberação e ativação da subunidade catalítica p110 $\alpha$ , que irá converter lipídeos de membrana PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> em PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>. A formação de PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>, leva à ancoragem de AKT (proteína quinase B), junto com o recrutamento e ativação da fosfatidilinositol dependente de proteína quinase-1 (PDK1) mTORC2, os quais irão fosforilar AKT nos resíduos T308 e S473, respectivamente. Uma vez fosforilada e ativada, AKT é responsável por regular numerosos processos celulares; como, a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, migração e síntese de proteína. A via de PI3K/AKT é cessada através da ação do supressor tumoral PTEN (fosfatase e tensina homóloga), ao qual é responsável por desfosforilar PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> em PtdIns-3,4-P<sub>2</sub>, cessando a via de sinalização e ativação (VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012; FRUMAN et al., 2017; HOXHAIJ; MANNING, 2020). Observa-se que em 30% dos tumores de cabeça e pescoço tem a perda de função de PTEN, ao qual, desencadeia uma

regulação negativa da via de PI3K-AKT (ABRAHAO et al., 2013).



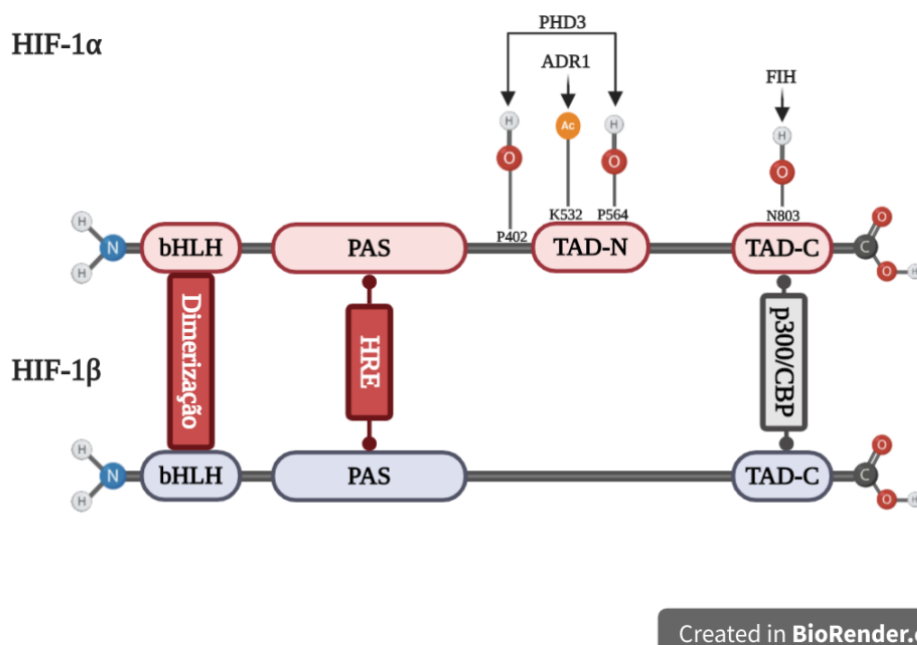
**Figura 6.** Processo de ativação e regulação da via de PI3K/AKT através de receptores com atividade pTyr e seus efeitos sobre ativação de processos celulares. Círculos em amarelo, denota um processo de fosforilação. Círculos com espinhos denotam os pontos de ativação e desativação das respectivas proteínas. **Created with BioRender.com**

Visto como uma das principais vias alterada e ativada em diversos tipos de câncer, PI3K/AKT, têm-se tornado um dos principais alvos de estudos para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. Embora alguns fármacos alvo para PI3K já tenham sido desenvolvidos e aprovados para tratamento, o seu uso ainda esbarra na sua alta toxicidade para o organismo e resistência gerada no tumor (THORPE; YUZUGULLU; ZHAO, 2015; FRUMAN et al., 2017; JANKU, 2017; VERRET et al., 2019; HOXHAI; MANNING, 2020; MADSEN; VANHAESEBROECK, 2020)

### 3.4. Via de Hipóxia

O complexo HIF-1 é um fator de transcrição que ativa a expressão de genes envolvidos em vários aspectos fisiológicos, como angiogênese, regulação do pH celular, metabolismo da glicose, entre outros. Esse complexo é composto por uma subunidade alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e uma subunidade nuclear beta (HIF-1 $\beta$ ) (Figura 7)(SEMENZA, 2007b). A

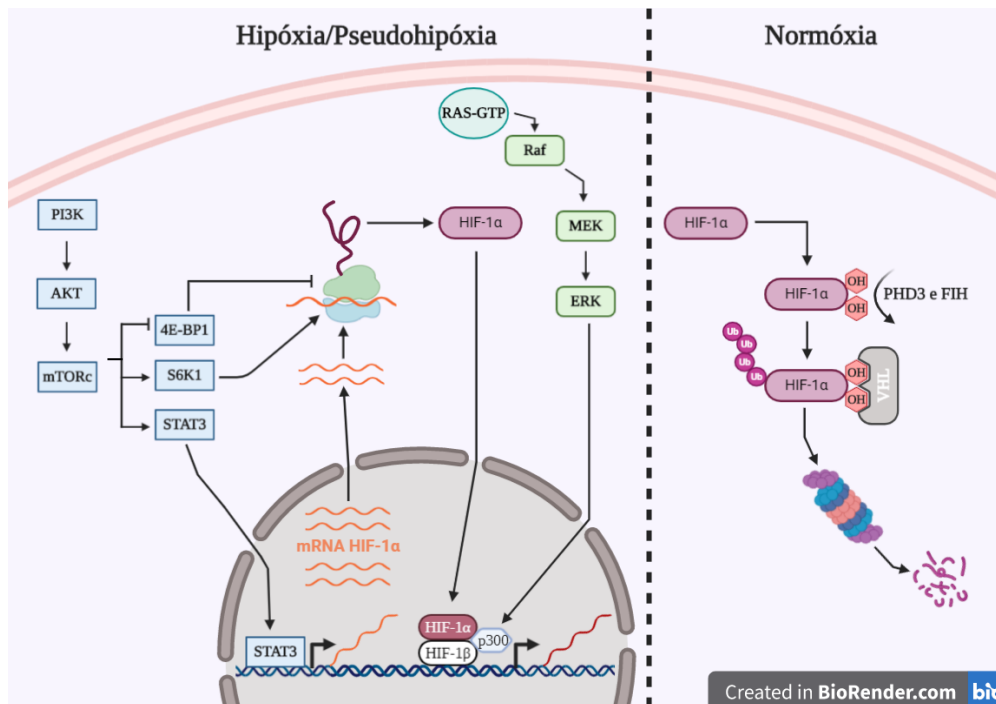
síntese de HIF1 $\alpha$  ocorre de forma constante, porém em condições de normóxia, a mesma é rapidamente degradada após sofrer modificação pós-traducional, como a adição de um grupamento hidroxil pelas prolin hidroxilases (PHDs) e do grupamento acetil pela ARD1 acetiltransferase, o que resulta na ligação do complexo von Hippel-Lindau (VHL) à proteína HIF-1 $\alpha$ , levando à sua ubiquitinação e, posteriormente, à degradação proteossomal. A atividade da HIF1 $\alpha$  é também controlada por meio da hidroxilação de um resíduo de asparagina pelo fator inibidor de HIF (FIH), que previne a interação de HIF-1 $\alpha$  com seu coativador de transcrição p300/CBP (Figura 8). Tanto a PHD3 como a FIH requerem oxigênio e  $\alpha$ -cetoglutarato como substratos; além de ferro e ascorbato como cofatores das reações (SEMENZA, 2003, 2007b).



**Figura 7.** Representação esquemática da proteína de HIF-1 $\alpha$  e  $\beta$ . Representado na proteína HIF-1 $\alpha$  os locais de hidroxilação e acetilação, juntamente com as respectivas proteínas responsáveis por essa modificação na proteína, ao qual em situação de normóxia, leva HIF-1 $\alpha$  à sua degradação proteossomal. Está também representada a região de interação entre HIF-1 $\alpha$  e  $\beta$  para formar o complexo transcricional ativo HIF-1 em situações de hipóxia, como: região de dimerização, local de interação no DNA promovido pelos elementos de resposta à hipóxia (HRE) e da região de ligação do co-ativador p300/ CBP. **Created with BioRender.com**

Sob condições de hipóxia, a subunidade HIF-1 $\alpha$  é estabilizada e translocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF-1 $\beta$ , formando o complexo

transcricionalmente ativo HIF-1, que se associa com co-ativadores transcricionais e promove a expressão de mais de 100 genes, que estão relacionados à progressão tumoral (SEMENZA, 2007b). Estudos mostram que a via de PI3K/AKT está diretamente envolvida no processo de regulação da transcrição, tradução e estabilização de HIF-1 $\alpha$  no citoplasma e a via de ERK1/2 na ativação do complexo transcricional de HIF-1, devido à fosforilação do co-ativador p300/CBP, que se liga a HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  aumenta a afinidade do complexo HIF-1/p300 (Figura 8) (MAGGIONI et al., 2011; DODD; TEE, 2015; HAYASHI et al., 2019).



**Figura 8.** Representação esquemática da regulação celular de HIF-1 $\alpha$  em situação de hipóxia, pseudohipóxia e normóxia. **Created with BioRender.com**

Mesmo em condições de normóxia, as células tumorais podem ativar o complexo HIF-1, em uma condição denominada de pseudohipóxia. Isso ocorre por uma mudança do metabolismo da glicose pela célula, o chamado de Efeito Warburg, no qual temos uma cascata de ativação causada por AKT1, a qual ativa mTORC1, sendo esse, responsável pelo aumento da transcrição, tradução e ativação de HIF-1 $\alpha$ . Durante esse processo, HIF-1 $\alpha$  é estabilizado e translocado para o núcleo para formar o complexo HIF-1, levando ao aumento da expressão gênica e tradução do transportador de glicose tipo I (GLUT1), da enzima lactato desidrogenase (LDH) e da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK1),

que limita a entrada de piruvato no ciclo de Krebs e favorece sua conversão em lactato como forma de obtenção de energia. Além disso, o complexo transcricional de HIF-1 favorece o aumento da expressão anidrase carbônica 9 (Ca-9), uma enzima fundamental na manutenção do pH intracelular de células tumorais (Figura 9) (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2020; HOXHAI; MANNING, 2020).

Uma das principais fontes utilizada para gerar energia nas células de mamíferos, a glicose, tem seu transporte do meio extracelular para o citosol realizado por 11 dos 14 tipos diferentes de transportadores de membrana, ao qual, estão divididos em três tipos de classes (1 - GLUTs 1-4, 14; 2 - GLUTs 5, 7, 9 e 11; 3 GLUTs 6, 8, 10, 12 e HMIT) codificados pelo gene SLC2. O primeiro transportador de membrana isolado e identificado foi GLUT1 (gene SLC2A1), por isso tem sido amplamente estudado até os dias atuais. GLUT1 tem sua expressão ubíqua em todo o organismo e o aumento na sua expressão pode ser observado em diversos tipos de tumor sólido, o que contribui para o aumento da captação de glicose e a progressão tumoral (AUGUSTIN, 2010; THORENS; MUECKLER, 2014).

Os tumores são altamente dependentes da glicose, para suprir demandas da produção proteínas, nucleotídeos e lipídeos (vias anabólicas), além da geração de ATP por uma via mais rápida, para sustentar seu acelerado metabolismo e rápida divisão celular. Para que isso ocorra as células tumorais optam por realizar a glicólise aeróbica (Efeito Warburg), ao qual converte piruvato em lactato. Esse processo ocorre devido o aumento da expressão e tradução de genes alvo do complexo HIF-1, como PDK1, LDH e GLUT1 (Figura 9). PDK1 tem a função de impedir que o piruvato formado na glicólise entre na mitocôndria e seja degradado até CO<sub>2</sub> (saldo de ~36ATP). Desta forma o piruvato é convertido em lactato pela enzima LDH. Toda essa alteração metabólica resulta em menor saldo total de ATP (saldo de 2 ATP por glicose) gerado no final do processo, entretanto, acelera a produção de macromoléculas pela via anabólica. Tal fato pode explicar a grande necessidade de aumentar a expressão de GLUT1 e sua estabilização na membrana plasmática, para assim aumentar a captação de glicose por essas células (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011).

A quebra da glicose em lactato leva à formação de metabólitos secundários como

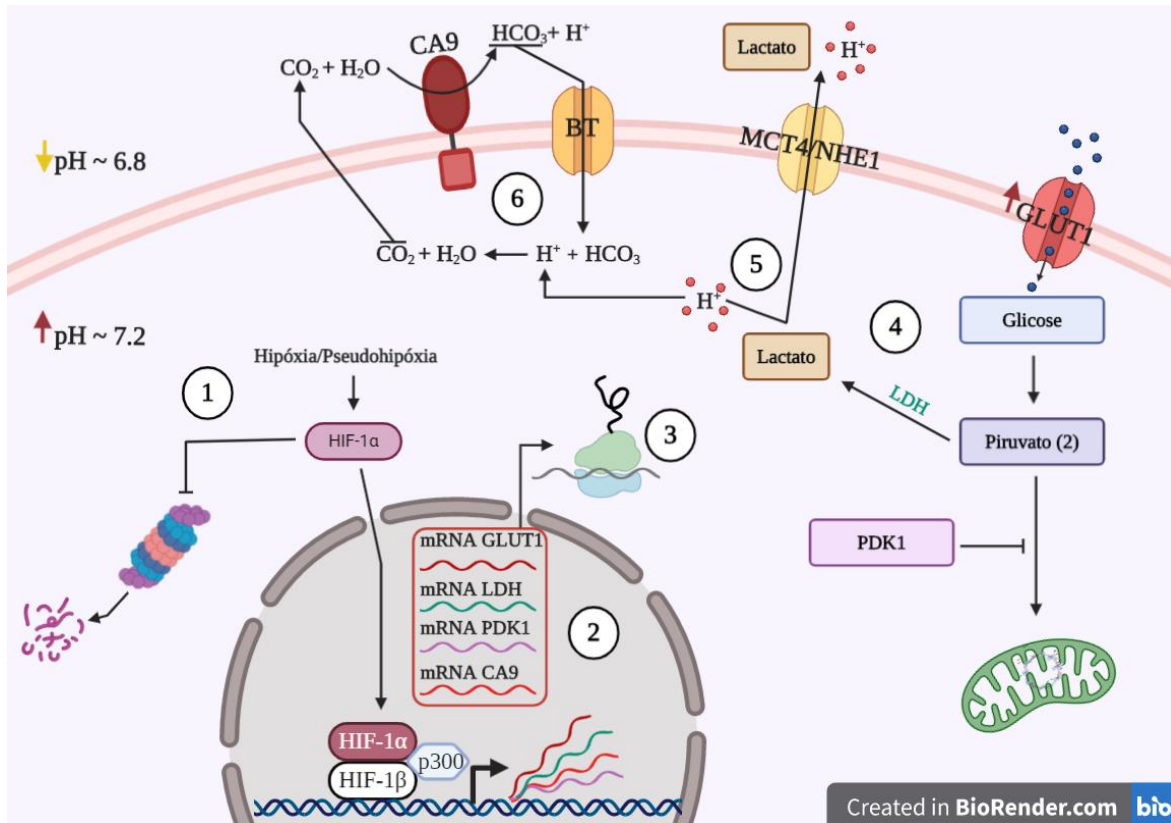


CO<sub>2</sub> e prótons H<sup>+</sup>, o que causa uma acidificação do meio intracelular. O meio intracelular ácido é incompatível com o funcionamento celular e sobrevivência. Desta forma, para manter o pH deste meio neutro, tanto o lactato como os prótons devem ser transportados para o meio extracelular, isso ocorre através de transportadores Monocarboxilato (MCT4) e Canais de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE1), o que contribui com a acidificação do microambiente extracelular, tornando o meio intracelular mais básico. Já o CO<sub>2</sub> presente, passa por difusão através da membrana plasmática para o meio extracelular, contribuindo também com a acidificação deste. No meio extracelular o CO<sub>2</sub> irá sofrer uma reação reversível de hidratação para formação de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), reação esta catalisada pela anidrase carbônica 9 (Ca9) (Figura 9), que são metaloenzimas compreendidas por 16 isoenzimas α-CAs que apresentam zinco (Zn<sup>2+</sup>) em seu sítio ativo (PASTOREKOVA et. al., 2008; CHICHE et. al., 2009).

O bicarbonato formado pela ação de Ca9 ( $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) será transportado para o interior da célula, por meio do transportador BT, onde se une a prótons intracelulares, produzindo H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, ajudando ainda mais a desacidificação do meio intracelular. Novamente, o CO<sub>2</sub> passará por difusão para o meio extracelular, a água por aquaporinas presente na membrana celular, onde sofrerão nova reação de hidratação para formar bicarbonato, liberando prótons capturados no meio intracelular, acidificando ainda mais o meio extracelular (PASTOREKOVA et. al., 2008).

Desta forma, com a expressão dos reguladores de pH, tais como: transportadores de membrana, bombas e isoenzimas (Anidrases Carbônicas), o ambiente intracelular é preservado neutro, mas produzindo uma acidose no meio extracelular típica de ambientes tumorais, contribuindo para sua progressão (STOLZE et al., 2006; RANKIN & GIACCIA, 2008; PASTOREKOVA et. al., 2008; VAN DEN BEUCKEN et. al., 2009; TEPPPO et. al., 2013; WARD et al., 2013).

Tumores de CECO possuem uma alta expressão de *HIF-1α*, *GLUT1* e *Ca9*, sendo sugestivo como marcador para prognóstico dos pacientes, pois estudos demonstram haver uma relação direta com o pior prognóstico do paciente, o que leva a um aumento do risco da morte desse paciente (ECKERT et al., 2012, 2019; MENDES et al., 2014; PETERLE et al., 2018).



**Figura 9.** Efeito Warburg em células tumorais. 1-2 Representação de como a hipóxia e a pseudohipóxia inibem a degradação proteossomal de HIF-1 $\alpha$ , levando a sua estabilização e migração para o núcleo, para formar o complexo transcricional ativo, pela dimerização com HIF1 $\beta$  e o complexo co-ativador p300/CBP. 2-3 Aumento da expressão de gênica e da tradução proteica, de proteínas ligadas a mudança de metabolismo da glicose em células tumorais. 4- Inibição da entrada do piruvato na mitocôndria e sua conversão em lactato pela via aeróbica da glicólise. 5- Aumento da concentração de prótons e lactato no meio intracelular, gerado pela degradação do piruvato e suas respectivas rotas de saída para meio extracelular. 6- Processo de desacidificação do meio intracelular realizado pela enzima CA9. **Created with BioRender.com**

## 4. Metodologia

### 4.1. Cultura celular

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

- SCC-9 – Linhagem celular derivada de carcinoma epidermoide de língua de um homem com 25 anos, não fumante (RHEINWALD; BECKETT, 1981).
- DOK (Queratinócitos orais displásicos) - A linhagem celular foi retirada de um fragmento dorsal da língua de um homem de 57 anos, fumante pesado, ao qual apresentava displasia epitelial leve a moderada. Onze anos depois do aparecimento da displasia, um carcinoma de células escamosas se desenvolveu no local e foi retirado. Posteriormente, a displasia remanescente foi removida, e a partir da parte que foi retirada, as culturas de células primárias que deram origem a DOK foram iniciadas (CHANG et al., 1992).

As linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), e cultivadas em parceria com o Laboratório de Biologia de Células Tronco (LABITRON) da FO-USP.

O cultivo de SCC9 foi realizado em meio de cultura contendo DMEM (Sigma-Aldrich), Ham-F12 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal, antimicótico/antibiótico e de hidrocortisona (50ng/mL). O cultivo de DOK foi realizado em meio de cultura contendo DMEN (Sigma-Aldrich), suplementada com 10% soro bovino fetal, antimicótico/antibiótico e hidrocortisona (5 ng/mL). Os dois cultivos celulares foram mantidos em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em garrafa de cultura de 175 cm<sup>2</sup>. O crescimento celular foi monitorado com auxílio de microscópio invertido Nikon<sup>®</sup> TS100F. O meio de cultivo das células era trocado a cada dois dias. No momento em que as células atingiram 80% de confluência, o meio foi totalmente aspirado e as células lavadas com 10 mL de PBS 1x estéril, e dispostas com 5 mL de tripsina a 0,05% durante 5 minutos em estufa a 37°C, até o desprendimento do frasco. Após o tempo decorrido foram adicionados 5 mL de meio de cultivo em cada frasco para inativar a tripsina. As células em suspensão foram transferidas para um tubo tipo Falcon<sup>®</sup> de 15 mL,

e centrifugadas a temperatura ambiente a 1,000 x g por 4 minutos; em seguida o sobrenadante foi aspirado e adicionado 1mL de meio de cultura específico para cada célula. Uma porção das células foi separada para realizar a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de azul de tripan. Após contagem, as células foram ressuspensas e distribuídas em placas de cultivo (6,12 e 96-well) a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, acondicionando novamente em estufa nas mesmas condições anteriores até atingirem a confluência de 80%. Após atingirem a confluência ideal, os meios foram trocados e as células foram expostas a uma mistura de meio de cultivo e nicotina (N3876 - Sigma) nas concentrações de 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, nos tempos de 8 e 24h.

#### **4.2. Ensaio de Viabilidade Celular**

A análise de viabilidade celular foi realizada a partir do método de Suforodamina B (SRB) em placa de 96 poços (SKEHAN et al., 1990). A técnica consiste em preencher cada poço da placa com 25 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e incubando à 4°C por 1h. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas em água corrente por cinco vezes e completamente secas em temperatura ambiente. A SRB foi adicionada a uma concentração de 0,4% (100 $\mu$ L/poço), incubando por 30 minutos em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas por quatro vezes com ácido acético 1% e posteriormente secas em temperatura ambiente. Para o processo de leitura foi adicionado Trizma-base à 15 mM, levando ao shaker por 1 hora, com intuito de solubilizar a SRB. Por fim, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 565nm em leitor de placa de Elisa. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$(m\u00e9dia\ OD\ tratamento / m\u00e9dia\ OD\ controle) \times 100$$

Onde, OD representa a absorbância média. O controle foi considerado 100%.

#### **4.3. Ensaio de cicatrização de ferida**

A análise de migração celular foi realizada através do ensaio de cicatrização de ferida. As linhagens celulares de SCC-9 e DOK foram cultivadas em placa de 12 poços ( $1 \times 10^5$ ) e incubada em estufa úmida à 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Após atingir confluência, uma ferida foi feita no centro da placa utilizando uma ponteira de pipeta p200. Em seguida, a

placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato 1x (PBS 1x) para remover o resto celular existente. Após lavagem, as células foram expostas às concentrações pré-determinadas de nicotina. Foram utilizadas como controle negativo células cultivadas apenas em meio de cultura. Para estimar a migração das células, foram capturadas três imagens de cada poço, no aumento de 10x, nos intervalos de tempo de 0, 8 e 24 horas, com auxílio de um microscópio invertido Nikon® TS100F. O software ImageJ® foi utilizado para calcular a área de ferida. A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada em comparação com a área da ferida do tempo 0h, com a seguinte fórmula:

$$\text{fechamento da ferida \%} = \left\{ \frac{(A_{t=0} - A_{t=\Delta h})}{A_{t=0}} \right\} \times 100$$

$A_{t=0}$  → Área da ferida mensurada imediatamente após realização

$A_{t=\Delta h}$  → Área da ferida mensurada h horas após realização

#### **4.4. Extração de RNA e teste de integridade**

A extração do RNA das células cultivadas foi realizada por meio de Trizol® (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante com algumas modificações.

Para a extração de RNA, o meio de cultura foi totalmente aspirado das placas e estas foram incubadas com 750µL de TRIZOL por 5 minutos. Após a lise celular, as células foram coletadas e transferidas para microtubos de centrífuga de polipropileno livres de RNase e DNase, adicionando-se a cada amostra 200µL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 10.200 x g durante 15 min à 4°C; em sequência a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para novos microtubos. Foram adicionados 500µL de álcool isopropílico em cada tubo, sendo o material mantido em gelo por 10 minutos, com intuito de aumentar a precipitação do RNA. Decorrido o tempo, os tubos foram centrifugados a 10.200 x g durante 10 min à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol 75% gelado adicionado a cada amostra. Logo após, os tubos foram centrifugados a 8.400xg durante 5 min. O etanol foi descartado e os microtubos foram deixados secando de cabeça para baixo à temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, o RNA foi ressuspensão. O RNA extraído foi quantificado e avaliado quanto a sua qualidade e concentração através

do aparelho NanoDrop<sup>TM</sup> 2000/2000c (Thermo Scientific), observando os padrões de comprimento de onda de 260 e 280 nm, que ficaram entre o padrão aceitável para RNA - 1.8 e 2.0. Para análise da integridade do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio, considerando íntegros aquelas amostras que apresentavam bandas ribossômicas 18S e 28S bem definidas.

#### **4.5. Tratamento e Síntese de cDNA**

As amostras foram previamente tratadas com DNase I (Invitrogen) e em seguida utilizadas para síntese de cDNA. A síntese foi realizada a partir de 1 µg de RNA utilizando Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription com RNase Inhibitor (Life Technologies<sup>TM</sup>), seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

#### **4.6. PCR em tempo real**

A análise da expressão gênica foi realizada através de PCR em tempo real em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Life Technologies<sup>TM</sup>), em volume final de 10 µL para cada reação. Os *primers* utilizados na reação encontram-se na Tabela 1 e foram desenhados utilizando a ferramentas PrimerQuest Tool e OligoAnalyzer Tool, disponibilizada pela empresa IDT<sup>TM</sup> (<https://www.idtdna.com/pages>). As reações de amplificação foram realizadas em triplicadas. Os níveis de transcritos em SCC9 foram normalizados em relação ao controle endógeno B2M (Beta-2-Microglobulina) e em DOK foram normalizados em relação ao controle endógeno GAPDH, sendo em seguida corrigidos em relação ao grupo controle (0 mM) de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

**Tabela 1.** Sequência dos primers para qPCR

GENE	Sequencia de <i>Primer</i>	Amplicon	Tm (°C)
<i>AKT1</i>	F:AGATCCTCAAGAAGGAAGTC R:TCTGGAAAGAGTACTTCAGG	120	58
<i>PIK3CA</i>	F:GCTTTCTGTCTCCTCTAAAC R:CAGAGGACATAATTCGACAC	75	57
<i>GLUT1</i>	F: CCAAGAGTGTGCTAAAGAAG R: CGACTCTCTTCCTTCATCT	76	58
<i>CA-IX</i>	F: GACATCCTAGCCCTGGTTTT R: CCTTTGGTCCCTTCTGTG	74	61
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	F:TTCAAGCAGTAGGAATTGGAAC R: CGTTCCAAGAAAGTGATGTAGTAG	115	60
<i>B2M</i>	F:ACTTTGTCACAGCCCAAGAT R:CCAAATGCGGCATCTTCAA	80	62
<i>GAPDH</i>	F: GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA R: GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	70	62

#### 4.7. Análise Estatística

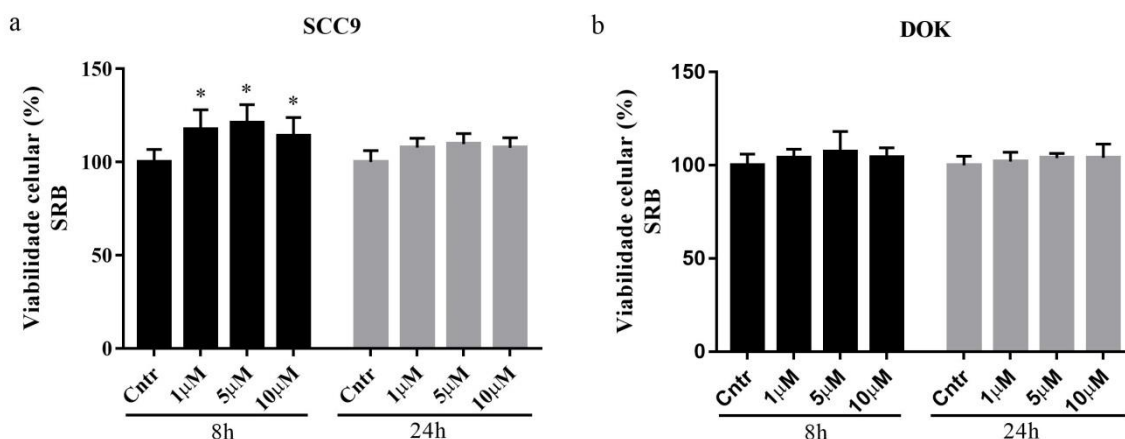
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad v.7.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Para ensaio de viabilidade por SRB e expressão gênica, quando realizado a comparação entre o controle e tratados, as análises estatísticas foram feitas através da Two-Way ANOVA com pós-teste Dunnett's. Já para mensuração da migração celular através do ensaio de cicatrização de ferida, foi utilizado Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para análise da expressão gênica entre os tempos de 8 e 24 horas da exposição as variadas concentrações de nicotina, foi utilizado Two-way ANOVA com pós-teste de Sidark. Foram admitidas diferenças estatísticas significativas somente quando  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. Teste de viabilidade das linhagens celulares de SCC9 e DOK expostas a diferentes concentrações de nicotina

A análise de viabilidade celular realizada através de SRB demonstrou que as concentrações de nicotina utilizada em nosso estudo foram capazes de alterar a viabilidade de SCC9 após 8 horas de exposição (Figura 10a). Como demonstrado, houve um aumento da viabilidade celular nas concentrações de 1 $\mu$ M (17%), 5 $\mu$ M (20%) e 10 $\mu$ M (14%) em comparação ao controle. No tempo de 24 horas, as concentrações de nicotina não foram capazes de gerar qualquer alteração na viabilidade de SCC9. (Figura 10a).

A viabilidade celular de DOK não foi afetada pelas concentrações de nicotina utilizadas em ambos os tempos de exposição utilizados nas avaliações (Figura 10b).

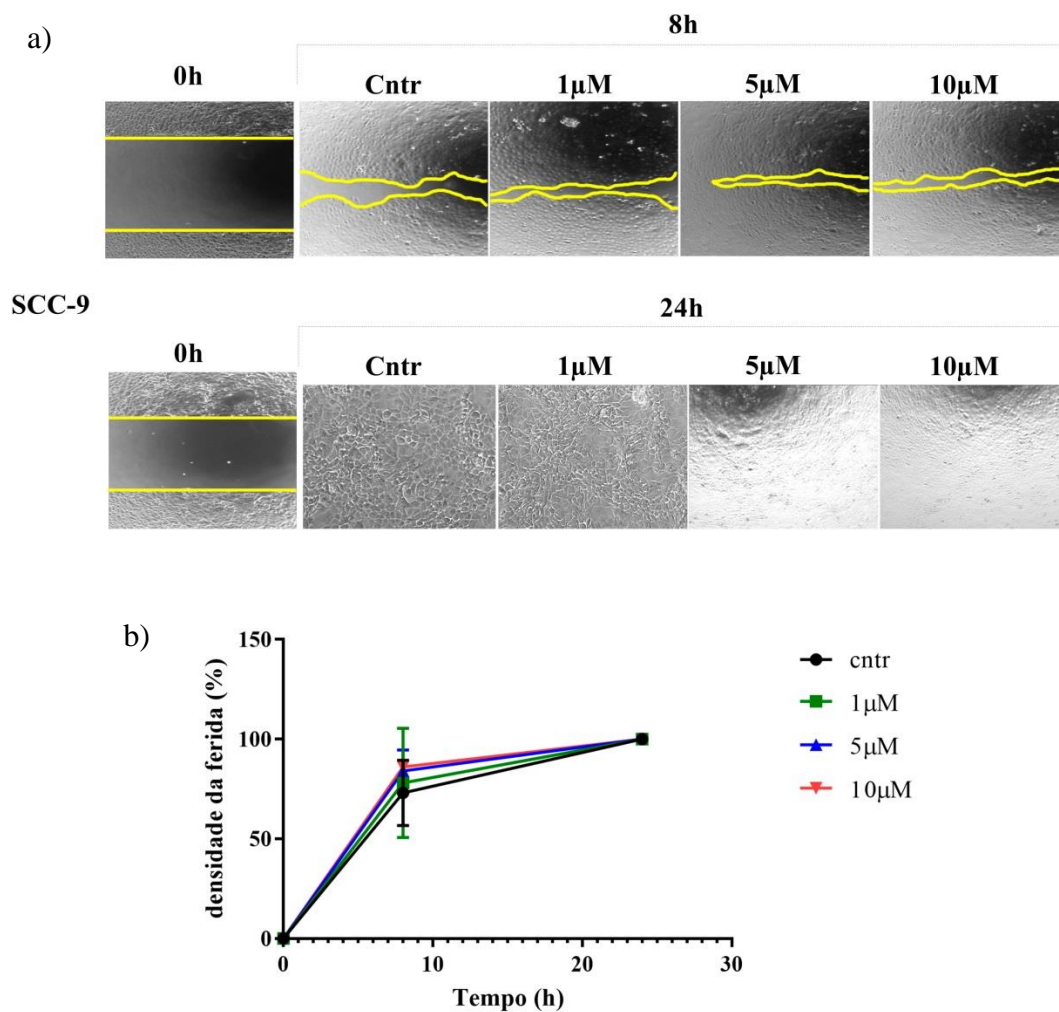


**Figura 10.** Efeito da nicotina sobre a viabilidade celular de SCC9 (a) e DOK (b), analisada por SRB nos tempos de 8 e 24 horas. Asteriscos (\*) indicam diferença significativa testada por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram realizados em sextuplicata.



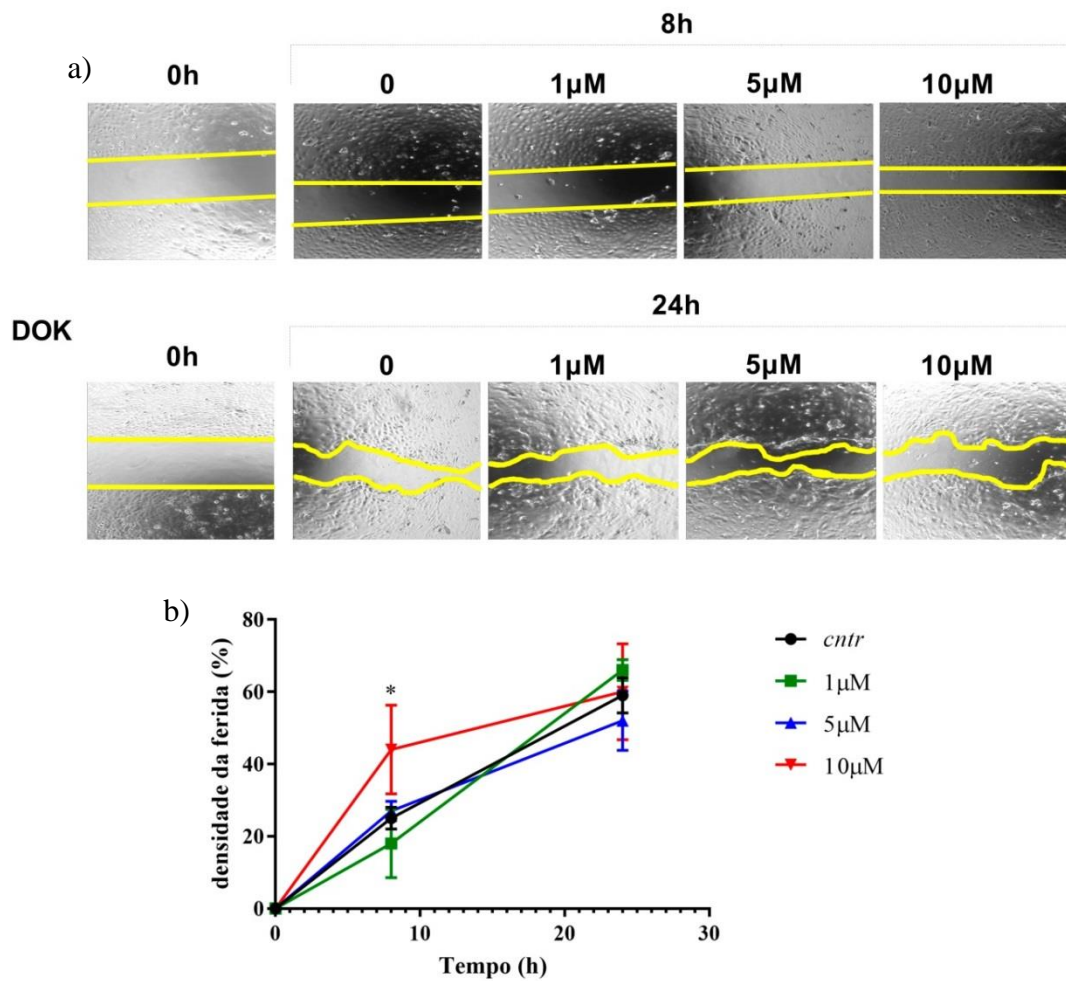
## 5.2. Efeito de diferentes concentrações de nicotina na migração celular das linhagens de SCC9 e DOK

O ensaio de ferida demonstrou não haver diferença na migração celular entre os tratamentos com nicotina e o controle na linhagem celular de SCC9, nos tempos de 8 e 24 horas (Figura 11a). A densidade do fechamento da ferida manteve-se inalterada ao longo do tempo em relação às concentrações de nicotina (1, 5 e 10 $\mu$ M) e o controle (Figura 11b).



**Figura 11.** Efeito das concentrações de nicotina sobre a migração celular de SCC9. As imagens acima representam o ensaio de ferida nos tempos de 0, 8 e 24 horas (a). O gráfico representa a densidade do fechamento da ferida em porcentagem quando comparado às concentrações de nicotina com o controle (b). Os dados foram analisados por two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Com relação à migração celular de DOK, nota-se que no tempo de 8 horas em 10  $\mu\text{M}$  de nicotina ocorreu aumento na migração celular e fechamento da ferida em 44% quando comparado ao controle (Figura 12). No entanto no tempo de 24 horas, não observamos diferença entre densidade do fechamento da ferida nas concentrações de nicotina em comparação com o controle.



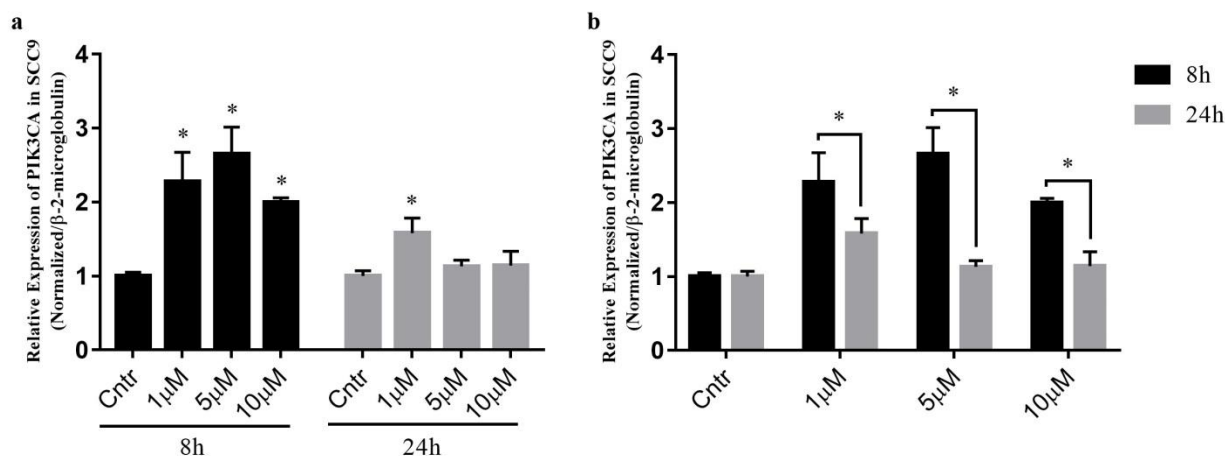
**Figura 12.** Efeito das concentrações de nicotina sobre a migração celular de DOK. Imagens representam o ensaio de feridas nos tempo de 0, 8 e 24 horas (a). Gráfico representa a densidade do fechamento da ferida em porcentagem em quando comparado às concentrações de nicotina com o controle (b). Asterisco (\*) indica diferenças significativas testadas por two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **5.3. Análise da expressão gênica em SCC9 e DOK expostas a diferentes concentrações de nicotina**

#### **5.3.1. *PIK3CA***

A análise da expressão *PIK3CA* em células SCC9 expostas à nicotina por 8 horas revelou um aumento significativo na expressão gênica de *PIK3CA* equivalente a 2,27, 2,65 e 1,99 vezes após exposição à 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de nicotina, respectivamente (Figura 13a). A exposição pelo período de 24 horas das células SCC9 à nicotina alterou a expressão de *PIK3CA* somente na concentração de 1  $\mu$ M, mantendo um aumento de 1,58 vezes em relação ao controle.

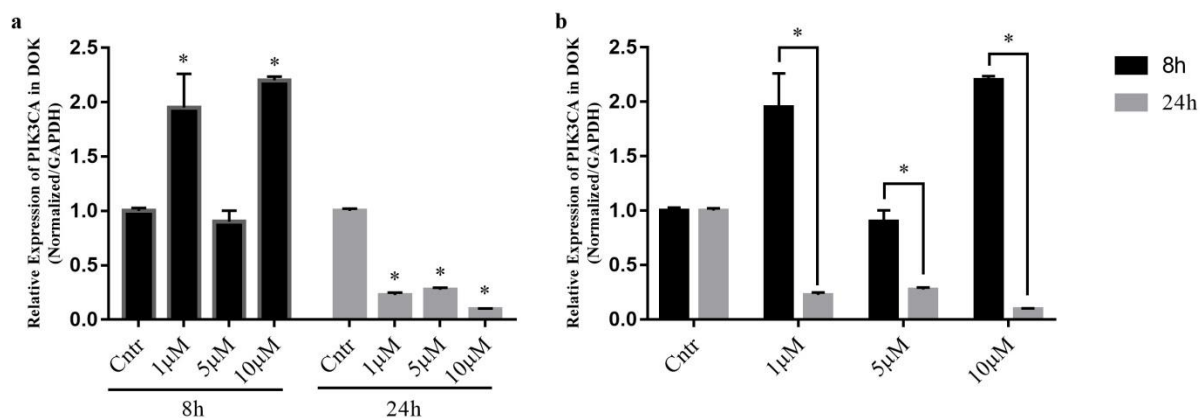
Fixando a concentração e comparando entre tempos de exposição à nicotina (8 e 24 horas), observamos a diminuição da expressão de *PIK3CA* de 8 para 24 horas em 1 $\mu$ M (1,43 vezes), em 5 $\mu$ M (2,34 vezes) e em 10 $\mu$ M (1,74 vezes).



**Figura 13.** Expressão relativa de *PIK3CA* em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *PIK3CA* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *PIK3CA* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

A expressão de *PIK3CA* na linhagem celular de DOK após 8 horas de exposição, teve um aumento nas concentrações de nicotina testadas de 1 (1,95 vezes) e 10  $\mu$ M (2,2 vezes), quando comparada ao seu controle (Figura 14a). A expressão de *PIK3CA* no tempo de 24 horas foi significativamente reduzida em ambas às concentrações em relação ao controle (Figura 14a).

Ao avaliar a mesma concentração de nicotina e sua relação com o tempo, observamos que a expressão de *PIK3CA* em células DOK em concentração de 1  $\mu$ M de nicotina diminuiu 8,66 vezes na exposição de 24 horas em relação a 8 horas. Na concentração de 5  $\mu$ M ocorreu diminuição de 3,2 vezes no tempo de 24 horas em relação à 8 horas. Já na maior concentração utilizada (10  $\mu$ M), pode se observar uma redução de 22,7 vezes na expressão de *PIK3CA* de 24 horas em relação a 8 horas de exposição à nicotina (Figura 14a).

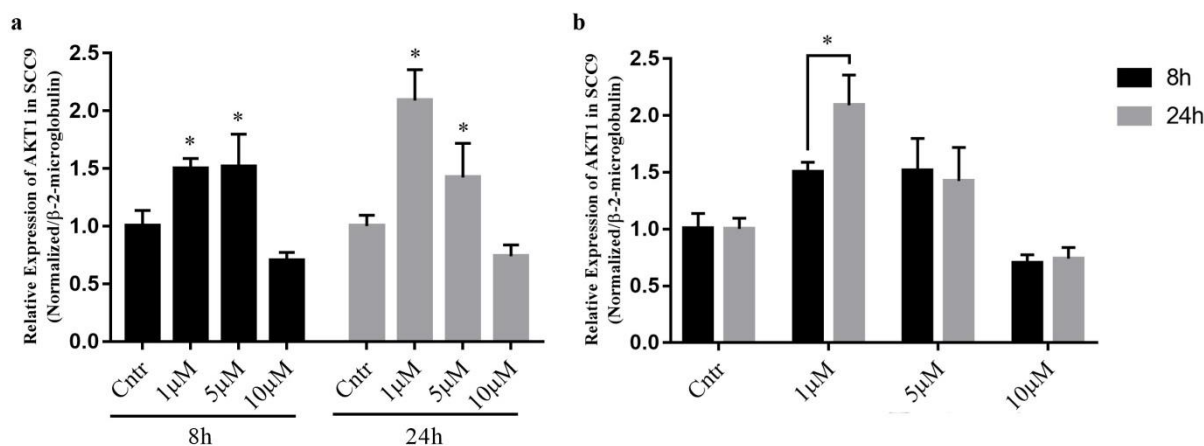


**Figura 14.** Expressão relativa de *PIK3CA* em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *PIK3CA* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *PIK3CA* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.3.2. *AKT1*

6. A expressão de *AKT1* em células SCC9 apresentou comportamento similar, embora em magnitudes diferentes, quando avaliadas após 8 e 24 horas de exposição às diferentes concentrações de nicotina. Em ambos os tempos de exposição ocorreu aumento na expressão de *AKT1* nas concentrações de 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M e nenhuma variação significativa na concentração de nicotina de 10  $\mu$ M, quando comparadas com o controle (Figura 15a). Após 8h de exposição à nicotina, o aumento na expressão de *AKT1* foi de 1,5 vezes nas concentrações de 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M, em relação ao controle. Em 24 horas de exposição à nicotina, ocorreu aumento da expressão de *AKT1* em 2,09 e 1,42 vezes nas concentrações de 1  $\mu$ M e 5  $\mu$ M, respectivamente, comparados ao controle (Figura 15a).

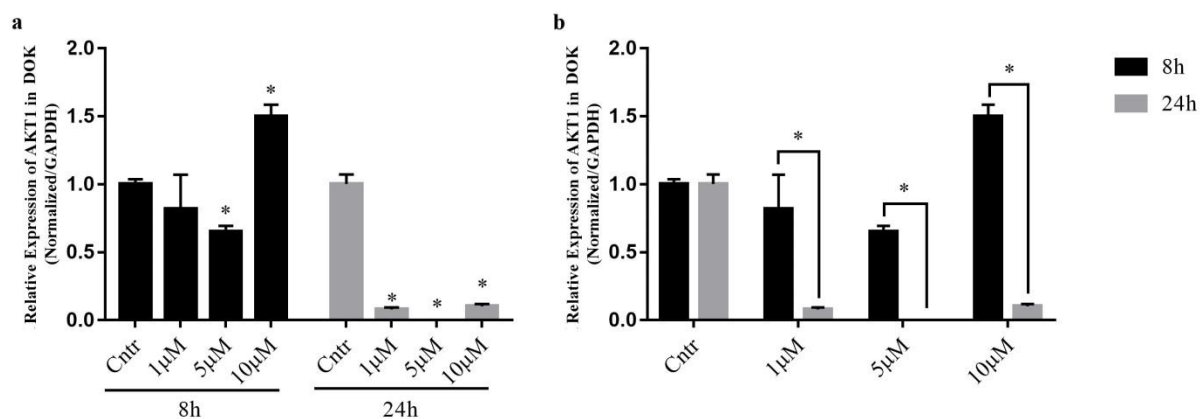
A análise comparativa entre tempos de exposição à nicotina em uma mesma concentração mostrou diferença somente na expressão de *AKT1* entre 8 e 24 horas na concentração de 1µM, onde ocorreu aumento de 1,39 vezes na expressão em 24 horas em relação a 8 horas (Figura 15b).



**Figura 15.** Expressão relativa de *AKT1* em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *AKT1* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *AKT1* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

Entre as concentrações de nicotina utilizadas nesse experimento apenas 10 µM (1,5 vezes) foi capaz de aumentar a expressão de *AKT1* na linhagem celular de DOK no tempo de 8 horas (Figura 16a). Já no tempo de 24 horas foram observadas reduções significativas da expressão de *AKT1* em relação ao controle em todas as concentrações de nicotina.

Quando comparado as iguais concentrações de exposição de nicotina entre o tempo de 8 e 24 horas (Figura 16b), pode se notar que houve uma diminuição da expressão de *AKT1* de 8 para 24 horas em 1  $\mu\text{M}$  (~10 vezes), 5  $\mu\text{M}$  (325 vezes) e 10  $\mu\text{M}$  (~14 vezes).



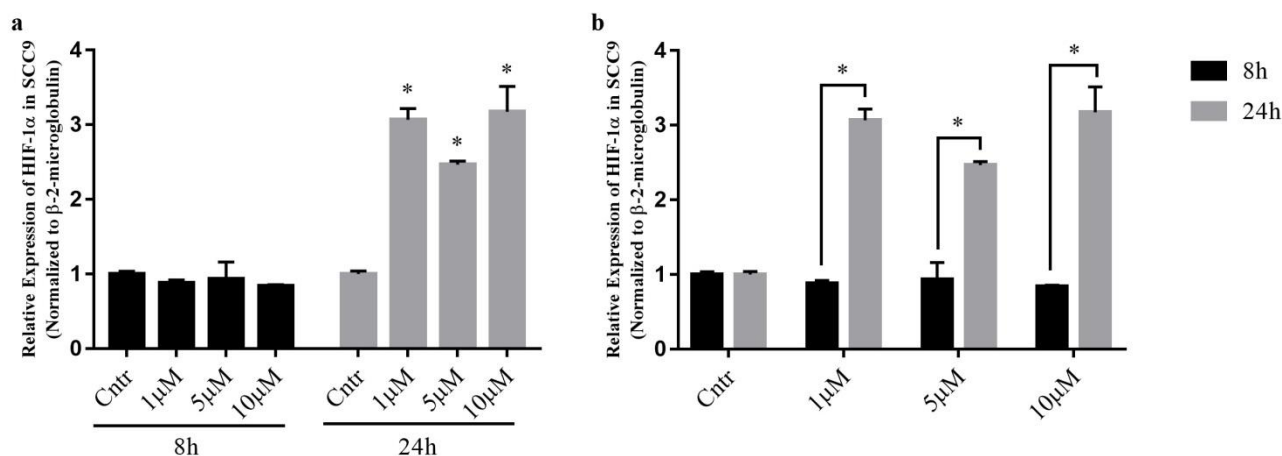
**Figura 16.** Expressão relativa de *AKT1* em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *AKT1* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *AKT1* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 6.1.1. *HIF-1 $\alpha$*

As concentrações de nicotina, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , não afetaram a expressão de *HIF-1 $\alpha$*  quando células SCC9 foram expostas por um tempo de 8 horas (Figura 17a). Entretanto, houve um aumento na expressão de *HIF-1 $\alpha$*  todas as concentrações de nicotina utilizadas após exposição de 24 horas. Esse aumento foi de 3,06, 2,46 e 3,17 vezes nas concentrações 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 17a).

A comparação entre os tempos de exposição de 8 e 24 na mesma concentração de nicotina, mostrou haver diferença na expressão de *HIF-1 $\alpha$*  nas concentrações 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e

10 $\mu$ M, sendo possível observar um aumento de 3,47, 2,64 e 3,77 vezes no tempo de 24 horas em relação ao tempo de 8 horas (Figura 17b).

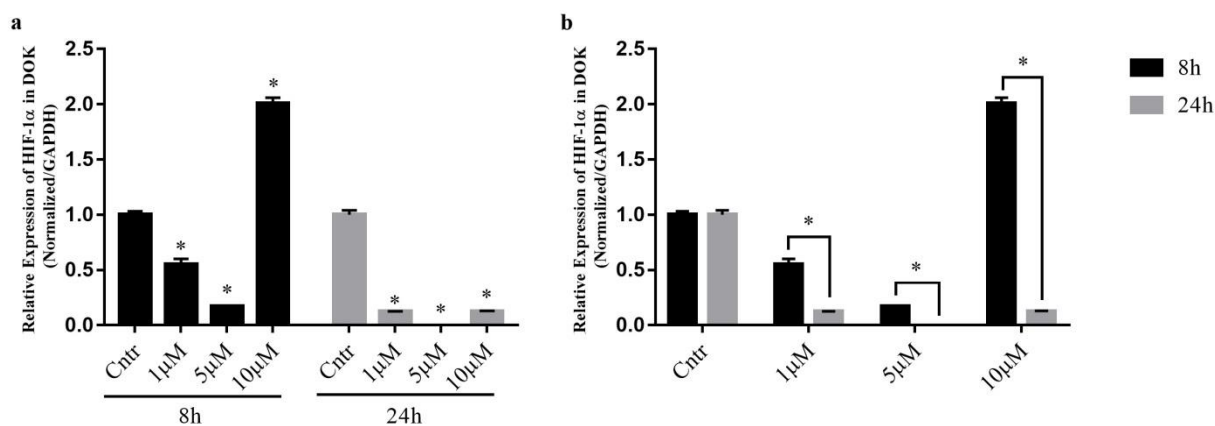


**Figura 17.** Expressão relativa de *HIF-1 $\alpha$*  em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *HIF-1 $\alpha$*  em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *HIF-1 $\alpha$*  entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação a DOK, nota-se que apenas a concentração de 10  $\mu$ m demonstrou ser capaz de aumentar a expressão de *HIF-1 $\alpha$*  na ordem de 2 vezes no tempo de 8 horas, quando comparada a expressão do controle (Figura 17a). Porém, após 24 horas pode-se observar que houve uma redução da expressão em todas as concentrações em comparação ao controle, onde podemos destacar uma alta redução de 38,5 vezes para concentração de 5  $\mu$ M (Figura 17a).



Verificamos que a expressão de *HIF-1α* foi reduzida em 16 vezes na concentração de nicotina de 10 μM no tempo de 24 horas em relação à 8 horas, quando comparado às iguais concentrações de exposição à nicotina (Figura 17b),



**Figura 18.** Expressão relativa de *HIF-1α* em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *HIF-1α* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *HIF-1α* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 6.1.2. *Glut1*

A expressão de *Glut1* foi diferencialmente afetada pelas concentrações de nicotina quando células SCC9 foram expostas pelo período de 8 horas (Figura 19a). Na concentração de 1 μM houve aumento de 2,3 vezes na expressão de *Glut1*. Em contrapartida, nas concentrações de 5 μM e 10 μM observamos redução na expressão de *Glut1* de 1,6 vezes e 1,5 vezes, respectivamente, quando comparado à expressão do controle. Também observamos que, a nicotina exerce efeito estimulatório na expressão de *Glut1* após 24 horas de exposição, e esse efeito independe da concentração testada.

Entretanto, a concentração de 1  $\mu\text{M}$  apresentou maior expressão de *Glut1* (3,7 vezes) em relação à 5  $\mu\text{M}$  (2,8 vezes) e 10  $\mu\text{M}$  (2,9 vezes), em relação ao controle.

Independente da concentração de nicotina, a expressão de *Glut1* mostrou-se sempre maior no tempo de 24 horas com relação a 8 horas de exposição (Figura 19b). As concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  aumentaram a expressão de *Glut1* na ordem de 1,6 vezes, 4,7 vezes e 5 vezes, no tempo de 24 horas em relação a 8 horas.

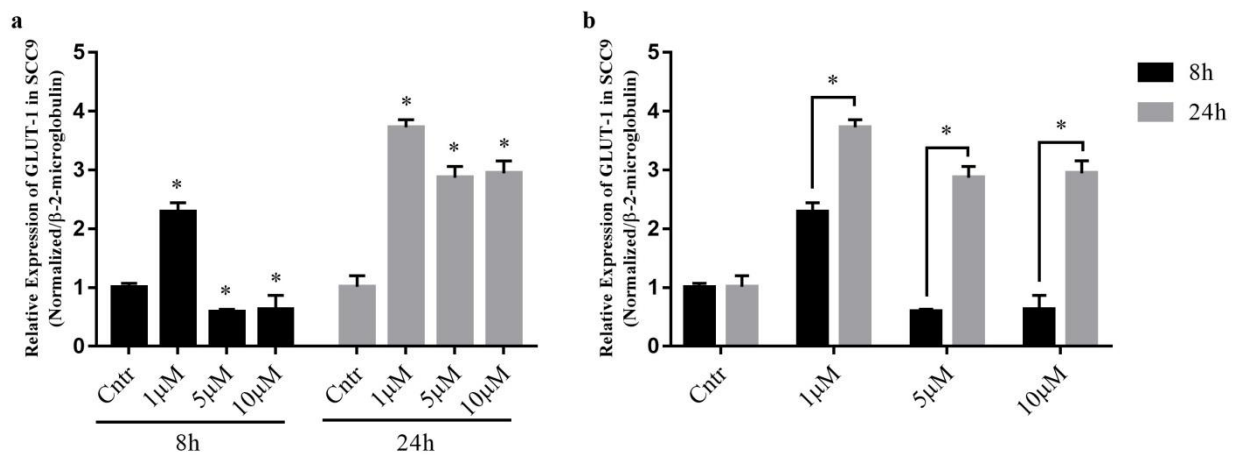
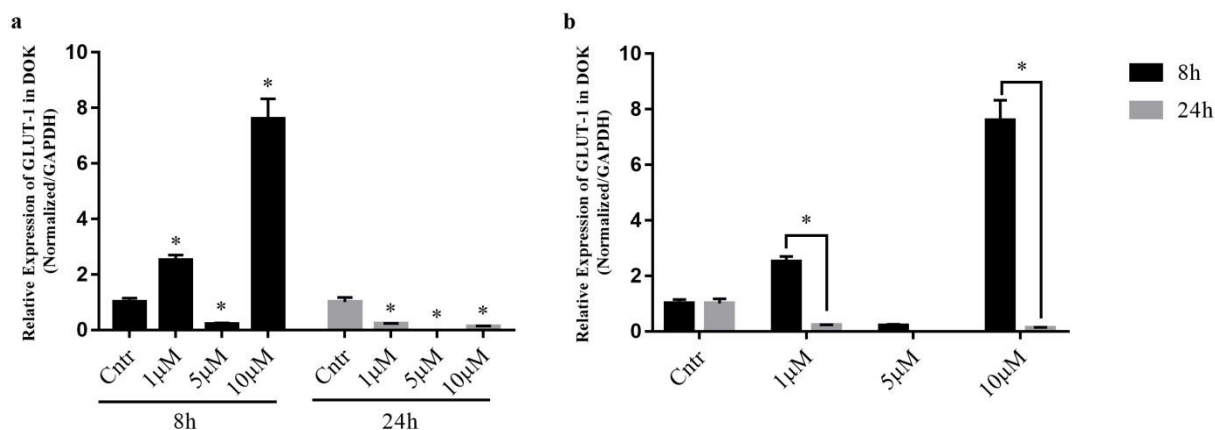


Figura 19. Expressão relativa de *GLUT1* em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *GLUT1* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *GLUT1* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

A expressão de *Glut1* em DOK 8 horas após exposição à nicotina foi aumentada em 2,5 e 7,6 vezes nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ . Contudo, na concentração de 5  $\mu\text{M}$  houve

uma diminuição expressiva de 4,8 vezes na expressão de *Glut1*, comparado ao controle (Figura 20a). Após 24 horas de exposição à nicotina, todas as concentrações de nicotina utilizadas nesse estudo reduziram a expressão de *Glut1*. Na concentração de 5  $\mu\text{M}$  não observamos expressão quando comparado com a expressão de *Glut1* do controle (Figura 20a).

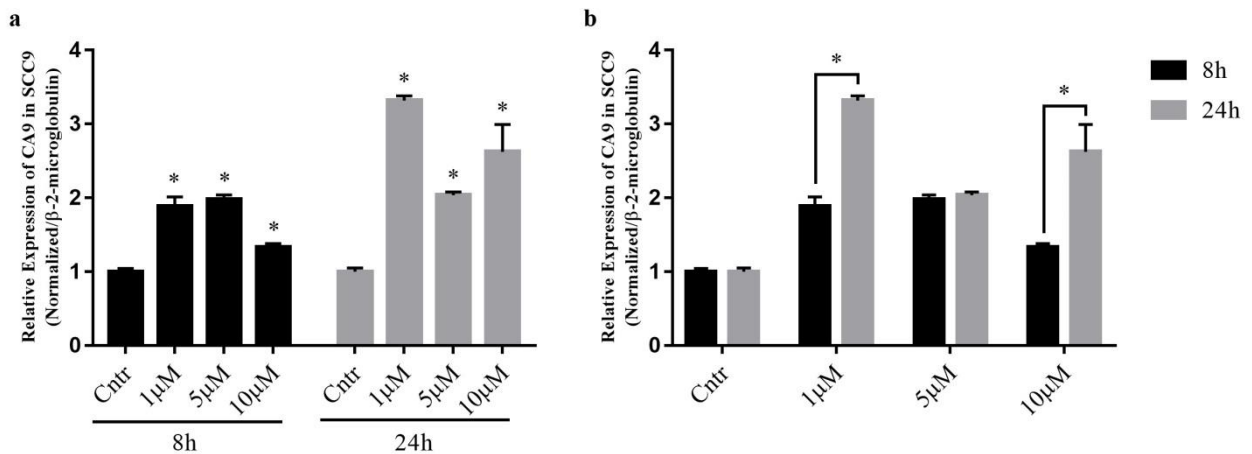
A comparação entre os tempos de 8 e 24 horas em uma mesma concentração de nicotina mostrou que a nicotina é capaz de reduzir a expressão de *Glut1* em concentrações de 1  $\mu\text{M}$  (~10 vezes) e 10  $\mu\text{M}$  (~56 vezes) no tempo de exposição de 24 horas em relação a 8 horas (Figura 20b).



**Figura 20.** Expressão relativa de *GLUT1* em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *GLUT1* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *GLUT1* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 6.1.3. *Ca9*

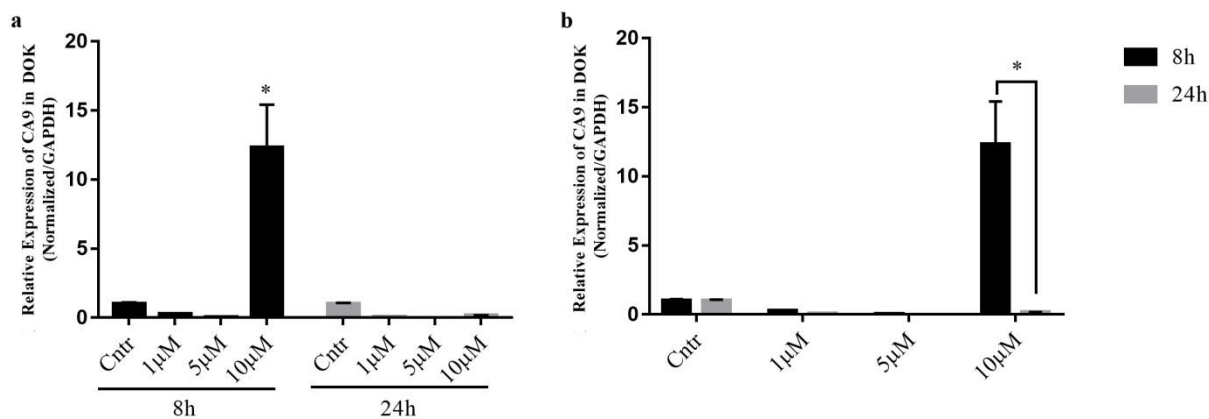
Em células SCC9, a nicotina é capaz de aumentar a expressão do gene *Ca9* após período de 8 horas e 24 horas de exposição. No tempo de 8 horas, esse aumento foi de 1,8, 1,9 e 1,3 vezes nas concentrações de 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente, em relação ao controle (Figura 21a). Já no tempo de 24 horas o aumento foi de 3,3 vezes, 2 vezes e 2,6 vezes nas concentrações de 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente, em relação ao controle (Figura 21a). Embora o aumento tenha sido comum em ambos os tempos de exposição observamos que na concentração de 1 $\mu$ M a expressão de *Ca9* foi aumentada em 1,8 vezes no tempo de 24 horas em relação a 8 horas. E na concentração de 10 $\mu$ M esse aumento foi de 2 vezes (Figura 21b).



**Figura 21.** Expressão relativa de *Ca9* em SCC9 nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *Ca9* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *Ca9* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

Por fim, analisamos o efeito da exposição à nicotina sobre a expressão de *Ca9* na linhagem celular de DOK. Observamos que no tempo de 8 horas a nicotina promoveu aumento na expressão de *Ca9* concentrações de 10  $\mu\text{M}$  de 12 vezes comparado ao controle (Figura 22 a). Após 24 horas de exposição, a expressão do gene *Ca9* foi significativamente diferente entre o controle e as demais concentrações (Figura 22 a).

As variações na expressão de *Ca9* entre 8 e 24 horas não foram significativas quando avaliamos as concentrações de 1 $\mu\text{M}$  e 5 $\mu\text{M}$ . Contudo na concentração de 10 $\mu\text{M}$  a expressão de *Ca9* foi significativamente reduzida (73 vezes) no tempo de 24 horas em relação a 8 horas (Figura 22b).



**Figura 22.** Expressão relativa de *Ca9* em DOK nos tempos de 8 e 24 horas de exposição a nicotina. (a) expressão relativa de *Ca9* em diferentes concentrações de nicotina após 8 e 24 horas de exposição. Asterisco (\*) indicam diferença significativa do controle negativo (Cntr) em seu respectivo tempo de exposição, por meio do teste two-way ANOVA com pós-teste Dunnett ( $p < 0,05$ ). (b) relação da expressão de *Ca9* entre tempo de exposição de 8 e 24 horas e mesma concentração de nicotina. Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre a mesma concentração de exposição a nicotina quando comparando entre o tempo de 8 e 24 horas pelo teste de two-way ANOVA com post hoc Sidak ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados são provenientes de três experimentos independentes, sendo demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão.

## 7. Discussão

O uso do cigarro é considerado um dos principais fatores de risco para o surgimento do CCO. Dentre os seus componentes, a nicotina é o principal alcalóide natural encontrado em grandes quantidades (SANNER; GRIMSRUD, 2015; CRAMER et al., 2019). A nicotina é bastante utilizada no tratamento de reposição para indivíduos que querem abandonar o hábito tabagista, além de ter seu consumo recreativo amplamente difundido através do cigarro eletrônico, como alternativa ao cigarro (SANNER; GRIMSRUD, 2015; SELYA et al., 2018; MARTÍNEZ et al., 2020). Por si só a nicotina não é considerada um agente capaz de promover a carcinogênese, mas pode desencadear o aumento da proliferação e migração, inibição da apoptose e aumento da quimiorresistência em CCO (LEE et al., 2005; XU et al., 2007; SULTAN; JESSRI; FARAH, 2018; NISHIOKA et al., 2019; WANG et al., 2019; HSU et al., 2020). De fato, as concentrações de nicotina utilizadas nesse trabalho confirmam sua capacidade em aumentar a viabilidade celular de SCC9, especialmente após 8 horas de exposição (Figura 10a), levando a supor que o tempo é crucial para causar um efeito significativo na viabilidade de SCC9.

Indivíduos tabagistas possuem maior risco de desenvolverem lesões pré-malignas na cavidade oral, contudo pouco é conhecido sobre os reais efeitos da nicotina sobre essas lesões. Estudos realizados com a linhagem celular DOK observaram que a nicotina aumenta a expressão de alguns marcadores ligados à progressão tumoral (GEMENETZIDIS et al., 2009), supressão da apoptose (WANG et al., 2017a) e de aumento da migração celular (WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018). Nossos resultados demonstraram que a exposição à nicotina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  no tempo de 8 horas levou a um aumento da migração celular em DOK (Figura 12), sem haver, no entanto, aumento na proliferação no ensaio de SRB (Figura 10b). Isso confirma que a nicotina possui um maior papel no aumento da atividade migratória em DOK, sem alterar proliferação da mesma.

A exposição à nicotina realmente mostrou ter maior efeito sobre a expressão de mRNA de *PIK3CA* em 8 horas (Figura 13). Esse resultado nos faz especular sobre uma possível ligação com aumento da viabilidade células de SCC9 em 8 horas (Figura 10a). Aumento nos níveis de expressão tanto gênica quanto proteica de *PIK3CA*, demonstra ter

uma relação com o aumento na progressão tumoral, além de caracterizar um pior prognóstico em paciente com câncer de cavidade oral/fumantes, cabeça e pescoço, próstata, cólon e gástrico (JHAWER et al., 2008; AGELL et al., 2011; COHEN et al., 2011; GARG et al., 2013; JANG et al., 2016; GARCÍA-ESCUADERO et al., 2018). Além disso, a utilização de siRNA para *PIK3CA* como uma forma de abordagem terapêutica foi capaz de reduzir a expressão gênica e proteica de *PIK3CA*, afetando desta forma a progressão de celular de tumor ósseo (proveniente de metástase de próstata) e de cólon (TAKESHITA et al., 2005; RYCHAHOU et al., 2006). Esses resultados reforçam a necessidade de realização de estudos mais abrangentes para análise da expressão gênica utilizando técnicas diferentes, seja via *knockdown* ou *knockout* de genes, que possam agregar conhecimento sobre o comportamento do gene e sua relação com desenvolvimento e/ou progressão tumoral. Adicionalmente a análise de expressão gênica pode ser realizada juntamente com análise proteica a fim de avaliar o reflexo final da expressão gênica, visto que é possível haver mecanismos de regulação pós transcricional.

Além da capacidade de aumentar expressão de mRNA de *PIK3CA* em linhagens de célula de câncer de cavidade oral, nós também observamos que de modo tempo dependente a nicotina aumentou a expressão nas linhagem celular com potencial malignizante (DOK) (Figura 14). Aumento na expressão de *PI3K* já foi descrito em amostras provenientes de tecidos displásicos de língua (WATANABE et al., 2009). Esses resultados evidenciam que o aumento da expressão do gene em questão poderia aumentar a ativação da via de PI3K/AKT estando ligado à carcinogênese da cavidade oral.

O aumento da expressão gênica e proteica de *AKT1* em linhagens celulares e tumores de CECO em comparação a linhagens celulares e tecidos normais provenientes da cavidade oral tem papel fundamental na progressão tumoral, destacando-se como um novo marcador alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (NAKASHIRO et al., 2015). A partir de nossos dados, foi possível observar que a exposição de SCC9 a 1  $\mu$ M de nicotina aumentou a expressão de *AKT1* com o passar do tempo (Figura 15). Similar ao nosso resultado, o tratamento com 1  $\mu$ M de nicotina em outra linhagem celular de CCO, causou o aumento da expressão da isoforma de mRNA de *AKT1* (ROY et al., 2019). Adicionalmente, os autores observaram um ganho da agressividade da proliferação, do potencial clonogênico e migração, que foi revertido quando utilizado siRNA específico

para *AKT1* (ROY et al., 2019). Em células DOK, o aumento da expressão de *AKT1* ficou restrita ao tempo de 8 horas e apenas quando exposto à concentração de 10  $\mu$ M de nicotina. Aumento da expressão da proteína p-AKT e TWIST já foram reportados em tecido de epitélio oral displásico, sugerindo a participação dos mesmos no processo de malignização do epitélio oral durante os estágios iniciais da carcinogênese (DE FREITAS SILVA et al., 2012; MARTINS et al., 2016). A exposição das células DOK a 10  $\mu$ M de nicotina causa um aumento da ativação da proteína AKT através da sua fosforilação (p-AKT), onde sua ativação está relacionada ao ganho de um fenótipo migratório através da superexpressão de FASN (do inglês fatty acid synthase) (WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018). Aumento na expressão de *AKT1* pode estar diretamente correlacionado com o aumento da proteína AKT fosforilada. Nesse trabalho, as análises foram limitadas à resposta da expressão gênica, o que nos limita a consolidar a ligação entre expressão de *AKT1* e proteína AKT fosforilada. Análises futuras poderão confirmar essa hipótese.

A ação da nicotina sobre as células do câncer é capaz de mimetizar uma situação de pseudo-hipóxia mesmo em condições normais de oxigênio, ao qual levam a um aumento da transcrição, tradução e estabilização citoplasmática de HIF1- $\alpha$  (GUO et al., 2012a). No entanto, os efeitos da nicotina sobre células de câncer são melhores exploradas e compreendidas no câncer de pulmão (MA et al., 2014). Neste experimento foi possível identificar que o efeito das concentrações de nicotina sobre a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  ocorreu de maneira tempo dependente, na qual observamos aumento da expressão somente após 24 horas da exposição (Figura 17). O nível de expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em tumores de CECO têm demonstrado ser um bom marcador de prognósticos, pois o aumento de sua expressão nesses tumores tem sido correlacionado a um pior prognóstico do paciente, devido a maior agressividade da progressão tumoral, angiogênese e metástase (ECKERT et al., 2010, 2012; MENDES et al., 2014). Outro ponto importante é que a ativação da via de PI3K/AKT/mTORC têm impacto direto no aumento da expressão gênica e proteica de *HIF-1 $\alpha$* , favorecendo também um fenótipo de maior agressividade da progressão tumoral, angiogênese, metástase e quimiorresistência (GUO et al., 2012a; WARREN et al., 2012; MA et al., 2014). Diferente do observado aqui nesse trabalho, linhagem celular de câncer de pulmão demonstram ter o pico da expressão de *HIF-1 $\alpha$*  após 8 horas de exposição à nicotina, com esse pico decaindo em 24 horas de exposição (GUO et al., 2012b). O aumento da expressão da proteína de HIF-1 $\alpha$  é observado na transição de lesões do epitélio



oral displásico para CECO, sendo sugestivo que o aumento dessa expressão tenha ligação ao início da transformação e malignização desse tipo de lesão (ZHANG et al., 2013; PATEL et al., 2019). Interessantemente, em DOK o aumento expressão gênica de *HIF-1α* ocorreu de forma contrária a SCC9, onde foi observado o aumento da expressão apenas em 8 horas e quando exposto a maior concentração de nicotina do estudo (Figura 18). Os resultados da expressão de *HIF-1α* apresentados aqui nos mostram que as diferenças encontradas podem estar associadas a uma resposta específica e dependente do tipo celular.

Em 1920, Otto Warburg observou em cultura de tecido tumoral uma mudança fenotípica em relação a tecidos normais, denominada de efeito Warburg (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011). Um dos efeitos observados é o aumento da expressão, tradução e migração da proteína de GLUT1 para membrana celular, aumentando a captação de glicose e sua metabolização por vias preferencialmente anaeróbicas (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2020; HOXHAI; MANNING, 2020). Como podemos notar a nicotina teve a capacidade de aumentar a expressão de *GLUT1* ao longo do tempo, atingindo maiores expressões após 24 horas de exposição (Figura 19). A alta expressão de proteica de GLUT1 possui uma correlação com um pior prognóstico em CECO, além disso, é observado aumento da sua expressão proteica em pacientes com CECO tabagistas em relação a não tabagistas (HARSHANI; YELURI; GUTTIKONDA, 2014; AZAD et al., 2016). Vale ressaltar que a expressão de mRNA de *GLUT1* proveniente de carcinoma hepatocelular é maior quando comparado ao tecido normal. Além disso, o bloqueio da expressão de *GLUT1* em cultura celular acarreta diminuição da entrada de glicose e saída de lactato, além da diminuição da migração e proliferação celular. Com isso, a expressão nesse tipo celular denota uma característica de maior agressividade do tumor (AMANN et al., 2009). Linhagens celulares de cavidade oral, como SCC25 e CAL27, possuem uma alta expressão de GLUT1, e o silenciamento da expressão com transfecção de shRNA culmina em diminuição da formação de colônia, viabilidade e aumento da apoptose (LI et al., 2013). Testes *in vivo*, demonstraram que o *Knockdown* de *GLUT1* em modelos de camundongo xenográficos diminui o volume do tumor e promove aumento na sobrevivência dos animais (LI et al., 2013).

Não foram encontrado na literatura dados que relacionem o efeito da exposição à nicotina sobre células displásicas de cavidade oral. Por isso acreditamos que nosso estudo

seja pioneiro ao realizar essa correlação, demonstrando que houve o efeito da nicotina sobre a expressão de *GLUT1* em DOK, onde foi possível notar a relação entre aumento na expressão gênica e exposição a maior dose de nicotina (Figura 20). Análise da localização na membrana da proteína de GLUT1 em displasia de cavidade oral têm demonstrado que sua expressão varia de média a moderada de acordo com o aumento do grau da displasia em resposta à hipóxia (ANGADI; ANGADI, 2015). Além disso, foi observado que a expressão de GLUT-1 na leucoplasia oral, pode ser usada como um marcador confiável para identificar grupos de alto risco para transformação maligna (DOSS et al., 2020). Acreditamos que devido a mudanças na rota metabólica de DOK ocasionada pela exposição da nicotina, possa favorecer o aumento da expressão, tradução e migração de GLUT1 para membrana celular, favorecendo o aumento da captação de glicose, e contribuindo para o processo de malignização.

A quebra da glicose em lactato em células tumorais leva à formação de metabólitos secundários como CO<sub>2</sub> e prótons H<sup>+</sup>, o que causa uma acidificação do meio intracelular tornando incompatível o funcionamento e sobrevivência. Desta forma, entra em ação outro importante alvo de transcrição do fator HIF-1 a anidrase carbônica 9 (*CA9*), uma proteína transmembrânica com o importante papel na regulação do pH intra e extracelular (ECKERT et al., 2019; PASTOREKOVA et al., 2008). Dados provenientes do “*The Cancer Genome Atlas (TCGA)*”, demonstram um aumento na expressão de mRNA de *CA9* em indivíduos acometidos por CECO em relação ao tecido normal. Adicionalmente, foi observado que tumores de CCO em estágios T2, 3 e 4 tem uma maior expressão proteica de *CA9* quando comparado a T1 (ECKERT et al., 2012; YANG et al., 2017). Análise de regressão realizada em paciente com CECO demonstrou que a maior expressão de mRNA de *CA9* estava relacionada ao aumento da recorrência locoregional, além de aumentar o risco dos pacientes virem a óbito quando comparado com amostras com menor expressão. Ademais, foi observado haver correlação entre o aumento da expressão de mRNA em relação a proteína de *CA9* (ECKERT et al., 2019). Neste contexto, podemos observar que a ação da nicotina teve a capacidade de aumentar a expressão de mRNA de *CA9* tanto em 8 como em 24 horas de exposição (Figura 21). O aumento da expressão de *CA9* em DOK ficou limitado à maior concentração e ao menor tempo de exposição à nicotina (Figura 22). Alguns estudos têm especulado que a superexpressão da proteína *CA9* em regiões displásicas de cavidade oral pode ser utilizado como um preditivo independente para o

aumento do risco de malignização dessas regiões (ZHANG et al., 2013; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2014). Esse aumento pode estar correlacionado com a capacidade da nicotina de mimetizar uma pseudo-hipóxia alterando o metabolismo da glicose. Com isso, o aumento na expressão de *CA9* pode estar ligado à ajuda no balanceamento do pH intracelular compatível a sobrevivência das células tumorais.

## **8. Conclusão**

Os dados do presente trabalho indicam a relação da exposição à nicotina com o aumento da expressão dos genes que possuem estrita relação com a alteração de metabólitos, sobrevivência, proliferação e inibição da apoptose nas linhagens SCC9 e DOK. Em SCC9, observamos variação na expressão de alguns genes de acordo com o tempo de exposição, já em DOK, os padrões da expressão se mostraram bem definidos dentro do tempo de 8 horas e de maneira dose-dependente.

Nossos achados levantam um questionamento a respeito de produtos que contenham uma alta concentração de nicotina, como o cigarro convencional e os eletrônicos, e como eles podem contribuir diretamente para o aumento do risco de malignização de regiões displásicas presentes na cavidade oral desses indivíduos ou mesmo contribuindo para o crescimento dos tumores de CECO, levando a uma pior perspectiva para os pacientes.

## 9. Referências

- ABRAHAO, A. C.; MOLINOLO, A.; LINGEN, M. W.; GUTKIND, J. S. PTEN Deficiency Contributes to the Development and Progression of Head and Neck Cancer 1. v. 15, n. 5, p. 461–471, 2013.
- AGELL, L.; HERNÁNDEZ, S.; SALIDO, M.; DE MUGA, S.; JUANPERE, N.; ARUMÍ-URIA, M.; MENENDEZ, S.; LORENZO, M.; LORENTE, J. A.; SERRANO, S.; LLORETA, J. PI3K signaling pathway is activated by PIK3CA mRNA overexpression and copy gain in prostate tumors, but PIK3CA, BRAF, KRAS and AKT1 mutations are infrequent events. **Modern Pathology**, v. 24, n. 3, p. 443–452, 2011.
- AMANN, T.; MAEGDEFRAU, U.; HARTMANN, A.; AGAIMY, A.; MARIENHAGEN, J.; WEISS, T. S.; STOELTZING, O.; WARNECKE, C.; SCHÖLMEIRICH, J.; OEFNER, P. J.; KREUTZ, M.; BOSSERHOFF, A. K.; HELLERBRAND, C. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 4, p. 1544–1552, 2009.
- ANGADI, V. C.; ANGADI, P. V. GLUT-1 immunoexpression in oral epithelial dysplasia, oral squamous cell carcinoma, and verrucous carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 57, n. 2, p. 115–122, 2015.
- ARAFEH, R.; SAMUELS, Y. PIK3CA in cancer: The past 30 years. **Seminars in Cancer Biology**, v. 59, n. January, p. 36–49, 2019.
- AUGUSTIN, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. **IUBMB Life**, v. 62, n. 5, p. 315–333, 2010.
- AZAD, N.; KUMARI MAURYA, M.; KAR, M.; GOEL, M. M.; SINGH, A. K.; SAGAR, M.; MEHROTRA, D.; KUMAR, V. Expression of GLUT-1 in oral squamous cell carcinoma in tobacco and non-tobacco users. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 1, p. 25–31, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.006>>.
- BADER, A. G.; KANG, S.; ZHAO, L.; VOGT, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 12, p. 921–929, 2005.
- BENOWITZ, N. L. Nicotine Addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2295–2303, 17 jun. 2010. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/physics/9809039>>.
- BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 515–534, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0129-z>>.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CHANG, S. E.; FOSTER, S.; BETTS, D.; MARNOCK, W. E. DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. **International Journal of Cancer**, v. 52, n. 6, p. 896–902, 1992.

CHANGEUX, J. P. The nicotinic acetylcholine receptor: A typical ‘allosteric machine’. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1749, 2018.

CHATURVEDI, P.; SINGH, A.; CHIEN, C. Y.; WARNAKULASURIYA, S. Tobacco related oral cancer. **The BMJ**, v. 365, n. June, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1136/bmj.l2142>>.

CHEN, R. J.; HO, Y. S.; GUO, H. R.; WANG, Y. J. Long-term nicotine exposure-induced chemoresistance is mediated by activation of Stat3 and downregulation of ERK1/2 via nAChR and beta-adrenoceptors in human bladder cancer cells. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 118–130, 2010.

CHENG, W.; CHEN, K.; LEE, K.; FENG, P.; WU, S. Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer. v. 11, 2020.

CHICHE, J., ILC, K., LAFERRIÈRE, J., TROTTIER, E., DAYAN, F., MAZURE, N. M., POUYSSÉGUR, J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p.358–68, 2009.

CHOU, H. C.; LIN, H. W.; YANG, J. H.; LIN, P. Y.; CHENG, S. J.; WU, Y. H.; KUO, Y. S. Clinical outcomes of oral cancer patients who survive for more than 5 years in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 118, n. 12, p. 1616–1622, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2019.07.022>>.

COHEN, Y.; GOLDENBERG-COHEN, N.; SHALMON, B.; SHANI, T.; OREN, S.; AMARIGLIO, N.; DRATVIMAN-STOROBINSKY, O.; SHNAIDERMAN-SHAPIRO, A.; YAHALOM, R.; KAPLAN, I.; HIRSHBERG, A. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 946–950, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.013>>.

CRAMER, J. D.; BURTNESSE, B.; LE, Q. T.; FERRIS, R. L. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 11, p. 669–683, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41571-019-0227-z>>.

DE BIASI, M.; DANI, J. A. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 105–130, 2011.

DE FREITAS SILVA, B. S.; YAMAMOTO, F. P.; PONTES, F. S. C.; CURY, S. E. V.; FONSECA, F. P.; PONTES, H. A. R.; DÉCIO-DOS SANTOS, P. J. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, p. 29–34, 2012.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. We need to talk about the Warburg effect. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 127–129, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>>.

DODD, K. M.; TEE, A. R. STAT3 and mTOR: Co-operating to drive HIF and angiogenesis. **Oncoscience**, v. 2, n. 11, p. 913–914, 2015.

- DOSS DM, NIRMAL M, VEERAVARMAL, SARAVANAN R, VENKATESH A. Evaluating the expression of GLUT-1 in oral leukoplakia. **J Oral Maxillofac Pathol.** 24(2):308-314, 2020,
- ECKERT, A. W.; HORTER, S.; BETHMANN, D.; KOTRBA, J.; KAUNE, T.; ROT, S.; BACHE, M.; BILKENROTH, U.; REICH, W.; GREITHER, T.; WICKENHAUSER, C.; VORDERMARK, D.; TAUBERT, H.; KAPPLER, M. Investigation of the prognostic role of carbonic anhydrase 9 (CAIX) of the cellular mRNA/protein level or soluble CAIX protein in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 375, 16 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/375>>.
- ECKERT, A. W.; KAPPLER, M.; SCHUBERT, J.; TAUBERT, H. Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 16, n. 2, p. 189–196, 2012.
- ECKERT, A. W.; SCHÜTZE, A.; LAUTNER, M. H. W.; TAUBERT, H.; SCHUBERT, J. HIF-1  $\alpha$  is a prognostic marker in oral squamous cell carcinomas. v. 25, p. 87–92, 2010.
- FOCUS, E.; SLOMINSKI, A. from ion current to kinase cascade . Focus on “Upregulation of nuclear factor- $\kappa$ B expression by SLURP-1 is mediated by  $\alpha$ 7 -nicotinic acetylcholine receptor and involves both ionic events and activation of protein kinases”. v. 38163, p. 885–887, 2010.
- FRANKE, T. F. PI3K/Akt: Getting it right matters. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6473–6488, 2008.
- FRUMAN, D. A.; CHIU, H.; HOPKINS, B. D.; BAGRODIA, S.; CANTLEY, L. C.; ABRAHAM, R. T. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 2017.
- GARCÍA-ESCUADERO, R.; SEGRELLES, C.; DUEÑAS, M.; POMBO, M.; BALLESTÍN, C.; ALONSO-RIAÑO, M.; NENCLARES, P.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, R.; SÁNCHEZ-ANICETO, G.; RUÍZ-ALONSO, A.; LÓPEZ-CEDRÚN, J. L.; PARAMIO, J. M.; LORZ, C. Overexpression of PIK3CA in head and neck squamous cell carcinoma is associated with poor outcome and activation of the YAP pathway. **Oral Oncology**, v. 79, n. January, p. 55–63, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.02.014>>.
- GARG, R.; KAPOOR, V.; MITTAL, M.; SINGH, M. K.; SHUKLA, N. K.; DAS, S. N. Abnormal expression of PI3K isoforms in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 416, p. 100–106, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.027>>.
- GEMENETZIDIS, E.; BOSE, A.; RIAZ, A. M.; CHAPLIN, T.; YOUNG, B. D.; ALI, M.; SUGDEN, D.; THURLOW, J. K.; CHEONG, S. C.; TEO, S. H.; WAN, H.; WASEEM, A.; PARKINSON, E. K.; FORTUNE, F.; TEH, M. T. FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.
- GRANDO, S. A. Connections of nicotine to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 419–429, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3725>>.

GRASSI, F.; FUCILE, S. Calcium influx through muscle nAChR-channels: One route, multiple roles. **Neuroscience**, v. 439, n. May, p. 117–124, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.011>>.

GUO, L.; LI, L.; WANG, W.; PAN, Z.; ZHOU, Q.; WU, Z. Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  expression in human non-small cell lung cancer cells ☆. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 6, p. 852–861, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.004>>.

GUO, L.; LI, L.; WANG, W.; PAN, Z.; ZHOU, Q.; WU, Z. Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human non-small cell lung cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 6, p. 852–861, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.004>>.

HARSHANI, J. M.; YELURI, S.; GUTTIKONDA, V. R. Glut-1 as a prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 3, p. 372–378, 2014.

HAYASHI, Y.; YOKOTA, A.; HARADA, H.; HUANG, G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer. **Cancer Science**, v. 110, n. 5, p. 1510–1517, 2019.

HOXHAI, G.; MANNING, B. D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 2, p. 74–88, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>>.

HSU, C. C.; TSAI, K. Y.; SU, Y. F.; CHIEN, C. Y.; CHEN, Y. C.; WU, Y. C.; LIU, S. Y.; SHIEH, Y.-S.  $\alpha$ 7-Nicotine acetylcholine receptor mediated nicotine induced cell survival and cisplatin resistance in oral cancer. **Archives of Oral Biology**, v. 111, n. 161, 2020.

INCA. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. [s.l: s.n.].

JANG, S. H.; KIM, K. J.; OH, M. H.; LEE, J. H.; LEE, H. J.; CHO, H. D.; HAN, S. W.; SON, M. W.; LEE, M. S. Clinicopathological significance of elevated PIK3CA expression in gastric cancer. **Journal of Gastric Cancer**, v. 16, n. 2, p. 85–92, 2016.

JANKOWSKI, M.; KRZYSTANEK, M.; ZEJDA, J. E.; MAJEK, P.; LUBANSKI, J.; LAWSON, J. A.; BROZEK, G. E-cigarettes are more addictive than traditional cigarettes—A study in highly educated young people. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 13, p. 4–13, 2019.

JANKU, F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. **Cancer Treatment Reviews**, v. 59, p. 93–101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.07.005>>.

JHAWER, M.; GOEL, S.; WILSON, A. J.; MONTAGNA, C.; LING, Y.-H.; BYUN, D.-S.; NASSER, S.; ARANGO, D.; SHIN, J.; KLAMPFER, L.; AUGENLICHT, L. H.; SOLER, R. P.; MARIADASON, J. M. PIK3CA Mutation/PTEN Expression Status Predicts Response of Colon Cancer Cells to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1953–1961, 15 mar. 2008.



Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

JOHNSON, D. E.; BURTNES, B.; LEEMANS, C. R.; LUI, V. W. Y.; BAUMAN, J. E.; GRANDIS, J. R. **Head and neck squamous cell carcinoma** *Nature Reviews Disease Primers*, 26 dez. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-020-00224-3>.

KARUNAKARAN, K.; MUNIYAN, R. Genetic alterations and clinical dimensions of oral cancer: a review. *Molecular Biology Reports*, n. 0123456789, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05927-0>.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 5, p. 325–337, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3038>.

LAI, K.; KILLINGSWORTH, M. C.; LEE, C. S. Gene of the month: PIK3CA. *Journal of Clinical Pathology*, v. 68, n. 4, p. 253–257, 2015.

LEE, H. J.; GUO, H. Y.; LEE, S. K.; JEON, B. H.; JUN, C. D.; LEE, S. K.; PARK, M. H.; KIM, E. C. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 34, n. 7, p. 436–443, 2005.

LI, S.; YANG, X.; WANG, P.; RAN, X. The effects of GLUT1 on the survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 32, n. 3, p. 624–634, 2013.

LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 27, p. 441–464, 2011.

MA, X.; JIA, Y.; ZU, S.; LI, R.; JIA, Y.; ZHAO, Y.; XIAO, D.; DANG, N.; WANG, Y.  $\alpha 5$  Nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in non-small cell lung cancer. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 278, n. 2, p. 172–179, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.023>.

MACHA, M. A.; MATTA, A.; CHAUHAN, S. S.; SIU, K. W. M.; RALHAN, R. Guggulsterone targets smokeless tobacco induced PI3K/Akt pathway in head and neck cancer cells. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011.

MADSEN, R. R.; VANHAESEBROECK, B. Cracking the context-specific PI3K signaling code. *Science Signaling*, v. 13, n. 613, p. 1–14, 2020.

MAGGIONI, D.; GAINI, R.; NICOLINI, G.; TREDICI, G.; GARAVELLO, W. **MAPKs activation in head and neck squamous cell carcinomas** *Oncology Reviews*, 2011. .

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>.

MARTÍNEZ, Ú.; MARTÍNEZ-LOREDO, V.; SIMMONS, V. N.; MELTZER, L. R.; DROBES, D. J.; BRANDON, K. O.; PALMER, A. M.; EISSENBERG, T.; BULLEN, C. R.; HARRELL, P. T.; BRANDON, T. H. How Does Smoking and Nicotine Dependence

Change After Onset of Vaping? A Retrospective Analysis of Dual Users. **Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 22, n. 5, p. 764–770, 2020.

MARTINS, F.; DE SOUSA, S. C. O. M.; DOS SANTOS, E.; WOO, S. Bin; GALLOTTINI, M. PI3K–AKT–mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 45, n. 10, p. 746–752, 2016.

MATSUMOTO, H.; TIAN, J.; UCHIDA, N.; WATABE-UCHIDA, M. Midbrain dopamine neurons signal aversion in a reward-context-dependent manner. **eLife**, v. 5, n. OCTOBER2016, p. 1–24, 2016.

MELOCHE, S.; POUYSSÉGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3227–3239, 2007.

MENDEL, J. R.; BAIG, S. A.; HALL, M. G.; JEONG, M.; BYRON, M. J.; MORGAN, J. C.; NOAR, S. M.; RIBISL, K. M.; BREWER, N. T. Brand switching and toxic chemicals in cigarette smoke: A national study. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0189928, 11 jan. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0189928>>.

MENDES, S. O.; SANTOS, M. Dos; PETERLE, G. T.; MAIA, L. D. L.; STUR, E.; AGOSTINI, L. P.; DE CARVALHO, M. B.; TAJARA, E. H.; LOURO, I. D.; TRIVILIN, L. O.; DA SILVA-CONFORTI, A. M. Á. HIF-1 $\alpha$  expression profile in intratumoral and peritumoral inflammatory cells as a prognostic marker for squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 15–16, 2014.

MURUGAN, A. K.; THI HONG, N.; FUKUI, Y.; MUNIRAJAN, A. K.; TSUCHIDA, N. Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas. **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 1, p. 101–111, 2008.

MUSK, A. W.; DE KLERK, N. H. History of tobacco and health. **Respirology**, v. 8, n. 3, p. 286–290, 2003.

NAKASHIRO, K. I.; TANAKA, H.; GODA, H.; IWAMOTO, K.; TOKUZEN, N.; HARA, S.; ONODERA, J.; FUJIMOTO, I.; HINO, S.; HAMAKAWA, H. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 4, p. 1273–1281, 2015.

NISHIOKA, T.; LUO, L. Y.; SHEN, L.; HE, H.; MARIYANNIS, A.; DAI, W.; CHEN, C. Nicotine increases the resistance of lung cancer cells to cisplatin through enhancing Bcl-2 stability. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1785–1792, 2014.

NISHIOKA, T.; TADA, H.; IBARAGI, S.; CHEN, C.; SASANO, T. Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cells through the  $\alpha 7$  subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 509, n. 2, p. 514–520, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.154>>.

PASTOREKOVA, S., ZATOVICOVA, M., PASTOREK, J. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 7, p.685–98, 2008.

PATEL, N. R.; JAIN, L.; MAHAJAN, A. M.; HIRAY, P. V.; SHINDE, S. S.; PATEL, P.

A. An Immunohistochemical Study of HIF-1 Alpha in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 71, n. 4, p. 435–441, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12070-019-01597-y>>.

PÉREZ-SAYÁNS, M.; SUÁREZ-PEÑARANDA, J. M.; TORRES-LÓPEZ, M.; SUPURAN, C. T.; GÁNDARA-VILA, P.; GAYOSO-DIZ, P.; BARROS-ANGUEIRA, F.; BLANCO-CARRIÓN, A.; GÁNDARA-REY, J. M.; GARCÍA-GARCÍA, A. Expression of CA IX in dysplasia adjacent to surgical resection margins of oral squamous cell carcinoma. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 89, n. 2, p. 91–97, 2014.

PETERLE, G. T.; MAIA, L. L.; TRIVILIN, L. O.; DE OLIVEIRA, M. M.; DOS SANTOS, J. G.; MENDES, S. O.; STUR, E.; AGOSTINI, L. P.; ROCHA, L. A.; MOYSÉS, R. A.; CURY, P. M.; NUNES, F. D.; LOURO, I. D.; DOS SANTOS, M.; DA SILVA, A. M. Á. PAI-1, CAIX, and VEGFA expressions as prognosis markers in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 6, p. 566–574, jul. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jop.12721>>.

QI, M.; LI, L.; LU, Y.; CHEN, H.; ZHANG, M.; WANG, M.; GE, L.; YANG, J.; SHI, N.; CHEN, T.; TANG, X. Proteome profiling to identify peroxiredoxin 1 interacting protein partners in nicotine-associated oral leukoplakia. **Archives of Oral Biology**, v. 108, n. July, p. 104537, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104537>>.

RANGANATHAN K, K. L. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. **Journal of oral and Maxillofacial Pathology**, v. 23, p. 19–27, 2019. Disponível em: <<https://www.jomfp.in/article.asp?issn=0973-029X;year=2019;volume=23;issue=1;spage=19;epage=27;aulast=Ranganathan>>.

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

RHEINWALD, J. G.; BECKETT, M. A. Tumorigenic Keratinocyte Lines Requiring Anchorage and Fibroblast Support Cultured from Human Squamous Cell Carcinomas. **Cancer Research**, v. 41, n. 5, p. 1657–1663, 1981.

ROY, N. K.; MONISHA, J.; PADMAVATHI, G.; LALHRUAITLUANGA, H.; KUMAR, N. S.; SINGH, A. K.; BORDOLOI, D.; BARUAH, M. N.; AHMED, G. N.; LONGKUMAR, I.; ARFUSO, F.; KUMAR, A. P.; KUNNUMAKKARA, A. B. Isoform-specific role of akt in oral squamous cell carcinoma. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 1–23, 2019.

RYCHAHOU, P. G.; JACKSON, L. N.; SILVA, S. R.; RAJARAMAN, S.; EVERS, B. M. Targeted Molecular Therapy of the PI3K Pathway. **Annals of Surgery**, v. 243, n. 6, p. 833–844, jun. 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00000658-200606000-00014>>.

SANKARANARAYANAN, R.; RAMADAS, K.; THOMAS, G.; MUWONGE, R.; THARA, S.; MATHEW, B.; RAJAN, B. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: A cluster-randomised controlled trial. **Lancet**, v. 365, n. 9475, p. 1927–1933, 2005.

- SANNER, T.; GRIMSRUD, T. K. Nicotine: Carcinogenicity and Effects on Response to Cancer Treatment – A Review. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. August, p. 1–10, 31 ago. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00196/abstract>>.
- SCHULLER, H. M. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 195–205, 2009.
- SELYA, A. S.; DIERKER, L.; ROSE, J. S.; HEDEKER, D.; MERMELSTEIN, R. J. The role of nicotine dependence in e-cigarettes' potential for smoking reduction. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 20, n. 10, p. 1272–1277, 2018.
- SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–732, 2003.
- SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. **Science's STKE**, v. 2007, n. 407, p. cm8–cm8, 2007a.
- SEMENZA, G. L. **Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway**. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, 2007b. .
- SEMENZA, G. L. Targets for cancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 207–14, 2012.
- SHI, Q.; LI, C.; ZHANG, F. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2899–2907, 2006.
- SHIMIZU, R.; IBARAGI, S.; EGUCHI, T.; KUWAJIMA, D. Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. p. 283–294, 2019.
- SCHMELZ I. Nicotine and other tobacco alkaloids. In: Jacobson M., Crosby D.G., editors. **Naturally Occurring Insecticides**. Marcel Dekker; New York, NY, USA: pp. 99–136, 1971.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.
- STOLZE, I. P.; MOLE, D. R.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. **Novartis Found Symp.**, v. 272, p.15–25, 2006.
- SULTAN, A. S.; JESSRI, M.; FARAH, C. S. Electronic nicotine delivery systems: Oral health implications and oral cancer risk. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, n. December, p. 1–7, 2018.
- SZYFTER, K.; NAPIERALA, M.; FLOREK, E.; BRAAKHUIS, B. J. M.; TAKES, R. P.; RODRIGO, J. P.; RINALDO, A.; SILVER, C. E.; FERLITO, A. Molecular and health effects in the upper respiratory tract associated with tobacco smoking other than cigarettes. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 11, p. 2635–2643, 2019.
- TAKESHITA, F.; MINAKUCHI, Y.; NAGAHARA, S.; HONMA, K.; SASAKI, H.;

- HIRAI, K.; TERATANI, T.; NAMATAME, N.; YAMAMOTO, Y.; HANAI, K.; KATO, T.; SANO, A.; OCHIYA, T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12177–12182, 2005.
- TEPPO, S., SUNDQUIST, E., VERED, M., HOLAPPA, H., PARKKISENNIEMI, J., RINALDI, T., NYBERG, P. The hypoxic tumor microenvironment regulates invasion of aggressive oral carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 4, p.76–89, 2013.
- THORENS, B.; MUECKLER, M. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 0, p. 121–138, 2014.
- THORPE, L. M.; YUZUGULLU, H.; ZHAO, J. J. PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7–24, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3860>>.
- VAN DER WAAL, I.; DE BREE, R.; BRAKENHOFF, R.; COEBERGH, J. W. Early diagnosis in primary oral cancer: Is it possible? **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 16, n. 3, p. 300–305, 2011.
- VAN DEN BEUCKEN, T., RAMAEKERS, C. H. M. A, ROUSCHOP, K., KORITZINSKY, M., WOUTERS, B. G. Deficient carbonic anhydrase 9 expression in UPR-impaired cells is associated with reduced survival in an acidic microenvironment. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 92, n. 3, p.437–42, 2009.
- VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: The path to discovery and understanding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3290>>.
- VERRET, B.; CORTES, J.; BACHELOT, T.; ANDRE, F.; ARNEDOS, M. Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 30, n. 10, p. x12–x20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz381>>.
- WADGAVE, U.; NAGESH, L. Nicotine replacement therapy: An overview. **International Journal of Health Science**, v. 10, n. 3, p. 425–435, 2016.
- WANG, C.; NIU, W.; CHEN, H.; SHI, N.; HE, D.; ZHANG, M.; GE, L.; TIAN, Z.; QI, M.; CHEN, T.; TANG, X. Nicotine suppresses apoptosis by regulating a7nAChR/Prx1 axis in oral precancerous lesions. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 75065–75075, 2017a.
- WANG, C.; XU, X.; JIN, H.; LIU, G. Nicotine may promote tongue squamous cell carcinoma progression by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signaling pathways. **Oncology Letters**, v. 13, n. 5, p. 3479–3486, 2017b.
- WANG, L.; SHAN, L.; ZHANG, S.; YING, J.; XUE, L.; YUAN, Y.; XIE, Y.; LU, N. PIK3CA gene mutations and overexpression: Implications for prognostic biomarker and therapeutic target in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.
- WANG, M.; NIU, W.; QI, M.; CHEN, H.; ZHANG, M.; WANG, C.; GE, L.; YANG, J.; MIAO, C.; SHI, N.; CHEN, T.; TANG, X. <p>Nicotine promotes cervical metastasis of

oral cancer by regulating peroxiredoxin 1 and epithelial–mesenchymal transition in mice. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 12, p. 3327–3338, 2019.

WANG, Y.; HE, J.; JIANG, H.; ZHANG, Q.; YANG, H.; XU, X.; ZHANG, C.; XU, C.; WANG, J.; LU, W. Nicotine enhances store-operated calcium entry by upregulating HIF-1 $\alpha$  and SOCC components in non-small cell lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2097–2104, 2018.

WARD, C., LANGDON, S. P., MULLEN, P., HARRIS, A. L., HARRISON, D. J., SUPURAN, C. T., KUNKLER, I. H. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, 39(2), p.171–9, 2013.

WARREN, G. W.; ROMANO, M. A.; KUDRIMOTI, M. R.; RANDALL, M. E.; MCGARRY, R. C.; SINGH, A. K.; RANGNEKAR, V. M. Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 11, p. 2519–2527, 2012.

WATANABE, S.; SATO, K.; OKAZAKI, Y.; TONOGLI, M.; TANAKA, Y.; YAMANE, G. yuki. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 50, n. 3, p. 125–133, 2009.

WILLIAMS, M.; LI, J.; TALBOT, P. Effects of Model, Method of Collection, and Topography on Chemical Elements and Metals in the Aerosol of Tank-Style Electronic Cigarettes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50441-4>>.

WISNIEWSKI, D. J.; MA, T.; SCHNEIDER, A. Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. **Experimental Cell Research**, v. 370, n. 2, p. 343–352, set. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482718303781>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mpower: offer help to quit tobacco use**. [s.l: s.n.]

XU, J.; HUANG, H.; PAN, C.; ZHANG, B.; LIU, X.; ZHANG, L. Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 8, p. 739–744, 2007.

YANG, J. S.; LIN, C. W.; HSIEH, Y. H.; CHIEN, M. H.; CHUANG, C. Y.; YANG, S. F. Overexpression of carbonic anhydrase IX induces cell motility by activating matrix metalloproteinase-9 in human oral squamous cell carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 47, p. 83088–83099, 2017.

YOUNG, R. P.; SCOTT, R. J. Inhaled nicotine and lung cancer: Potential role of the nicotinic acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 9, p. 4460–4461, 2020.

ZAINAL, N. S.; LEE, B. K. B.; WONG, Z. W.; CHIN, I. S.; YEE, P. S.; GAN, C. P.; MUN, K. S.; RAHMAN, Z. A. A.; SILVIO GUTKIND, J.; PATEL, V.; CHEONG, S. C. Effects of palbociclib in oral squamous cell carcinoma and the role of PIK3CA in conferring resistance. **Cancer Biology and Medicine**, v. 16, n. 2, p. 264–275, 2019.

ZHANG, Q.; TANG, X.; ZHANG, Z. F.; VELIKINA, R.; SHI, S.; LE, A. D. Nicotine

induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4686–4694, 2007a.

ZHANG, Q.; TANG, X.; ZHANG, Z. F.; VELIKINA, R.; SHI, S.; LE, A. D. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4686–4694, 2007b.

ZHANG, X.; HAN, S.; HAN, H. Y.; RYU, M. H.; KIM, K. Y.; CHOI, E. J.; CHA, I. H.; KIM, J. Risk prediction for malignant conversion of oral epithelial dysplasia by hypoxia related protein expression. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 478–483, 2013.

ZHANG Q, GANAPATHY S, AVRAHAM H, NISHIOKA T, CHEN C. Nicotine exposure potentiates lung tumorigenesis by perturbing cellular surveillance. **Br J Cancer**.;122(6):904-911, 2020.

## **Anexos**



## Anexo 1. Comprovante de submissão

04/02/2021

Gmail - MGAG: Submission Confirmation for Nicotine exposure increases PIK3CA, AKT1, ERK1 and HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in oral c...



Joaquim Gasparini <joaquimgasparini@gmail.com>

### **MGAG: Submission Confirmation for Nicotine exposure increases PIK3CA, AKT1, ERK1 and HIF-1 $\alpha$ mRNA expression in oral cancer cells lines - [EMID:66a9d57b30a3c36a]**

1 mensagem

**Molecular Genetics and Genomics (MGAG)** <em@editorialmanager.com>

4 de fevereiro de 2021 21:08

Responder a: "Molecular Genetics and Genomics (MGAG)" <editor@molecular-genetics-genomics.se>

Para: Joaquim Gasparini dos Santos <joaquimgasparini@gmail.com>

Dear Mr. Gasparini dos Santos,

Your submission entitled "Nicotine exposure increases PIK3CA, AKT1, ERK1 and HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in oral cancer cells lines" has been received by Molecular Genetics and Genomics

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/mgag/>.

We have sent an e-mail to all co-authors of this submission asking them to confirm their co-authorship. You can see the status of co-authorship confirmations under "Author Status" in your author main menu. Please check with your co-authors in case somebody does not confirm within reasonable time. In case of acceptance, a paper might not be published with outstanding co-author confirmations.

Thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Molecular Genetics and Genomics

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oaofunding](http://www.springer.com/oaofunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

**\*\*Our flexible approach during the COVID-19 pandemic\*\***

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/mgag/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=87c1e7942b&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1690811706913319172&simpl=msg-f%3A16908117069...> 1/1

## Anexo 2. Comprovante de publicação

### RESEARCH ARTICLE

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

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



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

### OPEN ACCESS

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

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

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

**Received:** September 9, 2017

**Accepted:** March 12, 2018

**Published:** March 28, 2018

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

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

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

## Abstract

### Aims

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

### Methods and results

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



MISS GABRIELA TONINI PETERLE (Orcid ID : 0000-0001-7735-936X)

Article type : Original Article

### PAI-1, CAIX and VEGFA expressions as prognosis markers in oral squamous cell carcinoma

Gabriela Tonini Peterle<sup>1</sup>, Lucas Lima Maia<sup>1</sup>, Leonardo Oliveira Trivilin<sup>2</sup>, Mayara Mota de Oliveira<sup>1</sup>, Joaquim Gasparini dos Santos<sup>1</sup>, Suzanny Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Elaine Stur<sup>1</sup>, Lidiane Pignaton Agostini<sup>1</sup>, Lília Alves Rocha<sup>3</sup>, Raquel Ajob Moysés<sup>4</sup>, Patrícia Maluf Cury<sup>5</sup>, Fábio Daumas Nunes<sup>3</sup>, Iúri Drumond Louro<sup>1</sup>, Marcelo dos Santos<sup>6</sup>, Adriana Madeira Álvares da Silva<sup>1\*</sup>

#### Affiliations of authors:

**1** Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES, Brazil.

**2** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. Alegre, ES, Brazil.

**3** Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brazil.

**4** Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brazil.

**5** Departamento de Medicina, Faculdade FACERES. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

**6** Escola Multicampi de Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Caicó, RN, Brazil.

**Running title:** PAI-1, CAIX and VEGFA in Oral Cancer

**Keywords:** PAI-1, CAIX, VEGFA, hypoxia, oral squamous cell carcinoma.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/jop.12721

This article is protected by copyright. All rights reserved.