

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

LUCAS DE LIMA MAIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO JMJD1A COMO MARCADOR
MOLECULAR DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E DE OROFARINGE**

VITÓRIA

2014

LUCAS DE LIMA MAIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO JMJD1A COMO MARCADOR
MOLECULAR DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E DE OROFARINGE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.

Co-orientador: Iúri Drumond Louro

**VITÓRIA
2014**

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCAS DE LIMA MAIA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO JMJD1A COMO MARCADOR MOLECULAR DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E DE OROFARINGE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Apresentada em 21 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Prof. Dr. Íuri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-Orientador)

Prof^a. Dr^a. Flávia Errera
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia
(Membro Interno)

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Universidade de São Paulo
(Membro Externo)

Dedico este trabalho as pessoas que me ajudaram a transpor e a vencer as inúmeras dificuldades e barreiras ao longo destes dois anos de mestrado. Meus sinceros agradecimentos. Obrigado!

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ser tão bondoso e me abençoar com tantas conquistas.

A Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti, por acreditar em mim e pelo voto de confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, meu co-orientador, por toda ajuda dada nos momentos necessários.

As pessoas do Laboratório de Patologia Bucal da USP por toda ajuda e auxílio dado na parte experimental e por terem me recebido de forma tão prestativa e acolhedora.

Ao Prof. Ms. Marcelo dos Santos pelos conselhos, pela ajuda na parte experimental e em especial na análise estatística.

Ao Prof. Ms. Leonardo Trivilin pela ajuda na análise das lâminas e pelos conselhos pertinentes e valiosos.

A todos os professores da pós-graduação pelo amplo conhecimento ensinado.

A secretária da pós-graduação por ter me ajudado em todos os problemas de forma tão educada e simpática.

A CAPES pela bolsa, sem ela tudo isso seria muito mais difícil.

A FAPES pelo auxílio dado a minha viagem para São Paulo.

A minha família, em especial a minha mãe, que me apoiou e sempre esteve ao meu lado me incentivando.

Aos meus tios João Maia e Norma Maia, e primo João Paulo Maia por terem me recebido em sua casa em Alegre sempre que precisei de forma tão carinhosa e educada.

Aos amigos pelas horas de relaxamento e pelo companheirismo e palavras de ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de trabalho pela convivência agradável, pelos conselhos diante algum problema na parte experimental ou não.

E a todos aqueles que me ajudaram a realizar este trabalho.

OBRIGADO!

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças” (Charles Darwin)

RESUMO

Câncer escamoso de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de tumor mais comum no mundo. Surgem aproximadamente 600.000 novos casos e 300.000 mortes ocorrem no mundo anualmente. A proteína JMJD1A é uma desmetilase de histona tendo um importante papel na regulação epigenética do DNA, ela tem sido relacionada com o desenvolvimento e prognóstico de diversos tipos de tumores. O objetivo do trabalho foi associar a expressão da proteína JMJD1A com características clinicopatológicas, prognósticas e a sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A análise foi realizada por meio da avaliação de lâmina de *tissue microarray* corada pela técnica de imuno-histoquímica. A análise foi feita pela avaliação positiva ou negativa da proteína, com nível fraco ou forte desta expressão nos casos em que a proteína estava presente. A análise da expressão da proteína JMJD1A foi realizada através da avaliação da expressão da proteína no núcleo e no citoplasma. A expressão da proteína foi diferencialmente significativa nas localizações núcleo e citoplasma. A expressão nuclear e citoplasmática mostrou relação com a presença de linfonodos acometidos. Além disso, a expressão citoplasmática mostrou relação com o infiltrado inflamatório e tamanho do tumor. Na análise multivariada, os linfonodos mostraram relação com a positividade da expressão da proteína no núcleo e no citoplasma, mas também mostraram associação com o tamanho do tumor. O nível da expressão da proteína no núcleo mostrou significância com a recidiva geral. Na análise multivariada a recidiva geral e o óbito tiveram relação com a forte expressão da proteína no núcleo. Além disso, o óbito mostrou associação com o estadiamento do tumor. A sobrevida doença específica teve relação com a forte expressão nuclear da JMJD1A e com o estadiamento tumoral. Dessa forma, a proteína JMJD1A se mostrou como um promissor marcador de prognóstico para pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.

Palavras Chaves: Câncer de cabeça e pescoço, JMJD1A, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Squamous cell cancer of the head and neck (HNSCC) is the sixth most common cancer in the world. There are approximately 600,000 new cases and 300,000 deaths occur worldwide each year. The JMJD1A protein is a histone demethylase having an important role in the epigenetic regulation of DNA, it has been associated with the development and prognosis of various types of tumors. The objective was to associate the expression of JMJD1A protein with clinicopathological characteristics, prognostic and survival of patients with head and neck cancer. The analysis was performed through the evaluation of tissue microarray slide stained by immunohistochemical technique. The analysis was performed by positive or negative evaluation of the protein with strong or weak level of this expression where the protein was present. Analysis of the expression of the protein JMJD1A was performed by evaluating the expression of the protein in the nucleus and cytoplasm. Protein expression was significantly differentially locations in the nucleus and cytoplasm. Nuclear and cytoplasmic expression was related to the presence of metastatic lymph nodes. Also, cytoplasmic expression was related to inflammatory infiltrates and tumor size. In multivariate analysis, the lymph nodes showed a positive relationship with protein expression in the nucleus and cytoplasm, but also showed association with tumor size. The level of protein expression in the nucleus showed significance with the general recurrence. In multivariate analysis the overall recurrence and death were related to the strong expression of the protein in the nucleus. Moreover, death was associated with tumor stage. The disease-specific survival was related to the strong nuclear expression of JMJD1A and tumor staging. Thus, the protein JMJD1A proved as a promising prognostic marker for patients with carcinoma of the head and neck.

Key Words: Head and neck cancer, JMJD1A, Immunohistochemical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Provável modelo de regulação da JMJD1A pela hipóxia	18
Figura 2: Modelo de ação da JMJD1A durante a hipóxia	20
Figura 3: Mapa do <i>tissue microarray</i>	28
Figura 4: Fotos pradonização JMJD1A	31
Figura 5: Sobrevidas da postividade e nível de expressão JMJD1A nuclear	38
Figura 6: Sobrevidas da postividade e nível de expressão JMJD1A citoplasmática.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização epidemiológica da casuística em relação ao gênero, idade e hábitos tabagista e etilista.	24
Tabela 2: Caracterização clínica da amostra em relação ao sítio, estadiamento, tamanho do tumor e linfonodos.	25
Tabela 3: Caracterização histopatológica dos casos segundo o grau de diferenciação, infiltração linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório, desmoplasia e necrose.	26
Tabela 4: Caracterização do tratamento e prognóstico da casuística de acordo com a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, recidiva geral, recidiva local e óbito. (Continua na próxima)	26
Tabela 4: Caracterização do tratamento e prognóstico da casuística de acordo com a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, recidiva geral, recidiva local e óbito. (Continua na primeira)	27
Tabela 5: Comparação entre as expressões JMJD1A no núcleo e no citoplasma.....	32
Tabela 6: Análise da positividade e do nível de expressão nuclear JMJD1A segundo as características clinicopatológicas	33
Tabela 7: Análise da positividade e do nível de expressão citoplasmática JMJD1A segundo as características clinicopatológicas.....	34
Tabela 8: Análise multivariada da relação da positividade expressão nuclear e citoplasmática da JMJD1A com <i>status</i> linfonodal.....	35
Tabela 9: Análise da positividade e do nível de expressão nuclear JMJD1A segundo as características prognósticas	36
Tabela 10: Análise multivariada da relação do nível de expressão nuclear JMJD1A com recidiva e óbito.	36
Tabela 11: Análise da positividade e do nível de expressão citoplasmática JMJD1A segundo as características prognósticas.	37
Tabela 12: Análise multivariada da relação do nível de expressão nuclear JMJD1A com sobrevida doença específica.	39

LISTA DE SIGLAS

ADM- Adrenomedulina

CAIX – Anidrase carbônica

CCNA1- Ciclina A1

CCND1 – Ciclina D1

CECP – Câncer epidermóide de cabeça e pescoço

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GDF15- Fator de crescimento diferencial 15

GLUT1 – Transportador de glicose 1

GLUT2 –Transportador de glicose 2

HIF – Fator induzível de hipóxia

HOXA1 - *homeobox A1*

HR – *Hazard Ratio*

IL-10- Interleucina 10

IL-6- Interleucina 6

JMJD1A - *Jumonji Domain 1A*

MIF- Fator inibitório da migração de macrófagos

Oct 4 - *octamer-binding transcription factor 4*

OR – *Odds Ratio*

pN – Linfonodos

pT- Tamanho do tumor

TNF- Fator de necrose tumoral

TNM – Classificação dos tumores malignos

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço	14
1.2 Hipóxia e Câncer	16
1.3 JMJD1A	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Aspectos Éticos	23
3.2 Casuística	23
3.2.1 Caracterização da Casuística.....	24
3.3 Construção do TMA (<i>Tissuemicroarray</i>)	27
3.4 Reação de imuno-histoquímica	28
3.5 Análise da expressão da proteína JMJD1A.....	29
3.6 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXOS	52
Anexo 1.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço

Câncer de cabeça e pescoço é um termo genérico definido para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade oral, seios paranasais, faringe e laringe, além de glândulas e da pele de revestimento da cabeça e do pescoço. Cerca de 40% dos tumores de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e o restante nos demais sítios remanescentes (glândulas salivares, tireoide, cavidade nasais) (DOBROSSY, 2005). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma epidermóide, presente em mais de 90% dos casos (DEDIVITIS *et al.*, 2004).

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de tumor mais comum no mundo com aproximadamente 600.000 novos casos e cerca de 300.000 mortes ocorrendo anualmente. Pouco mais de 40% dos pacientes com CECP sobrevivem por mais de 5 anos após o diagnóstico (LEEMANS *et al.*, 2010; STRANSKY *et al.*, 2011).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), é esperado para o ano de 2014 576 mil novos casos de câncer, sendo que desses, estima-se que 15.290 de câncer oral e 7.640 de laringe (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

Os fatores de risco mais significativos identificados para doença são o uso de tabaco, consumo de álcool, os quais parecem ter efeito sinérgico. Um subgrupo de CECP particularmente os que se localizam na orofaringe, possui relação com a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (MAILLOT *et al.*, 2001, OGDEN, 2005; SEITZ, 2007; HECK, *et al.*, 2009; LEEMANS *et al.*, 2010; STRANSKY *et al.*, 2011).

Pacientes do sexo masculino, indivíduos mais velhos, de baixa renda e escolaridade estão mais sujeitos ao aparecimento ou estadios mais avançados da doença, porém para ocorrer o desenvolvimento dos tumores uma combinação de fatores precisa acontecer, o que inclui fatores ambientais relacionados ao estilo de vida, fatores genéticos de suscetibilidade, incluindo a eficácia do organismo em metabolizar substâncias carcinogênicas, bem como a habilidade das células em reparar danos acumulados no DNA ou, alternativamente, promover a apoptose quando muitos danos tenham ocorrido (SCHANTZ *et al.*, 2000).

As características tumorais com maior importância para a prática da clínica oncológica são o tamanho do tumor, presença de linfonodos cervicais acometidos e metástase à distância, classificando o paciente segundo o manual TNM. A partir do TNM os pacientes são classificados em estadios, sendo que o estadio I são os tumores classificados como T1N0, estadio II, os tumores classificados como T2N0, estadio III os tumores classificados como T3N0 ou T1N1, T2N1, T3N1 e o estadio IV é composto pelo tumor T4 em qualquer condição N ou T1, T2, T3 com N maior ou igual a 2 (SOBIN *et al.*, 2011). E o tratamento geralmente é realizado por meio de algumas abordagens terapêuticas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O protocolo terapêutico é definido de acordo com o estadio em que o paciente se classifica (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Recentemente, muitos genes expressos tem sido relacionados com o surgimento, progressão e prognóstico da doença. Entre esses genes estão os oncogenes, supressores de tumor e outros relacionados à condição de hipóxia. (SAR *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

1.2 Hipóxia e Câncer

Hipóxia consiste na condição em que as células que estão localizadas longe dos vasos sanguíneos tem o seu suprimento de oxigênio reduzido (GILKES & SEMENZA, 2013). O processo de hipóxia nas células ocorre quando a taxa de crescimento e metabolismo supera o suprimento de oxigênio vascular, levando a uma baixa concentração de oxigênio celular, e assim interferindo em diversos processos importantes para a sobrevivência da célula. A resposta a condição de hipóxia também pode acontecer pela ação de alguns agentes, mesmo na presença de oxigênio, como é o caso do níquel, cobalto, o ferro-quelante (deferroxamina) e dimetiloxalilglicina (DMOG; um análogo de 2-oxoglutarato) (CHEN & COSTA, 2009; SEMENZA, 2012).

A resposta á hipóxia é caracterizada pela a alteração do padrão de expressão de genes para se adaptar e sobreviver às condições desfavoráveis produzidas pelo ambiente hipóxico, por meio da ativação da via glicolítica anaerobiótica e estímulo da angiogênese (SEMENZA, 2013). Esta resposta não somente é importante para o desenvolvimento normal da célula mas também tem uma forte influência na progressão de células tumorais (KRIEG *et al.*, 2010).

Exposição a hipóxia induz a estabilização do fator induzível de hipóxia 1 (HIF1). Em condições de baixo teor de oxigênio, a subunidade HIF1-alpha (HIF-1 α) é estabilizada e traslocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF1-beta (HIF-1 β), formando o complexo HIF1 transcricionalmente ativo. Já em condições de normóxia, a HIF-1 α é rapidamente degradada pela ubiquitinação mediada pelo proteossomo (SAR *et al.*, 2009).

A hipóxia ativa os Fatores Induzíveis de Hipóxia (HIFs) que são reguladores essenciais de resposta a essa condição, eles regulam a transcrição de genes envolvidos no metabolismo, angiogênese, diferenciação, invasão e metástase. (KRIEG *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013). A hipóxia ocorre em muitas condições patológicas como doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral, retinopatia diabética, glaucoma, câncer e outras anormalidades (VAVILALA *et al.*, 2012).

A resposta a hipóxia é essencial para o crescimento de tumores sólidos, tendo uma grande influência no desenvolvimento, na progressão e no tratamento da doença. A hipóxia intratumoral afeta muitos dos principais processos relacionados à biologia do câncer, tais como a invasão celular, metástase e a estimulação à morte celular. Hipóxia intratumoral e/ou a expressão de proteínas relacionadas a esta condição são preditivas de pior prognóstico em casos de câncer de mama, cabeça e pescoço, câncer de pulmão, cervical e colorretal. Dessa forma, a resposta a hipóxia contribui para um ambiente tumoral hostil e para um fenótipo neoplásico mais agressivo (UEMURA, *et al.*, 2010).

Embora a hipóxia leve a morte de algumas células tumorais, ela estabelece uma forte pressão seletiva que resulta na sobrevivência das células mais agressivas e com maior potencial de promover metástase. Essas células conseguem escapar do ambiente hipoxico nocivo pela ação de estímulos que levam a glicólise anaeróbica, angiogênese, ativação de fatores pró-angiogênicos, remodelação da matriz extracelular e indução de outras vias metastáticas que conseqüentemente favorecem a recidiva tumoral e metástase. Além disso, como dito anteriormente a hipóxia induz a expressão de alguns genes que estão associados a um pior prognóstico em casos de câncer em humanos (YAMADA *et al.*, 2012).

A presença do crescimento tumoral em condições de hipóxia também tem um importante impacto na eficácia dos tratamentos contra o câncer. Tumores hipoxicos são resistentes a radioterapia e quimioterapia desde que estes tratamentos dependam da geração de radicais livres de oxigênio para induzir danos letais no DNA (SAR *et al.*, 2009).

Já está bem descrito na literatura alguns genes que são alvos da HIF-1 como é o caso do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), gene necessário para angiogênese, genes transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT2), CAIX (anidrase carbonica), gene responsável pela regulação pH celular (MELSTROM *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2011; ISA *et al.*, 2014). Nos últimos anos, outros genes tem sido identificados como sendo alvos da HIF-1 como, por exemplo, o gene JMJD1A (*Jumonji Domain 1A*) (Figura1) (WELLMANN *et al.*, 2008; SAR *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2012).

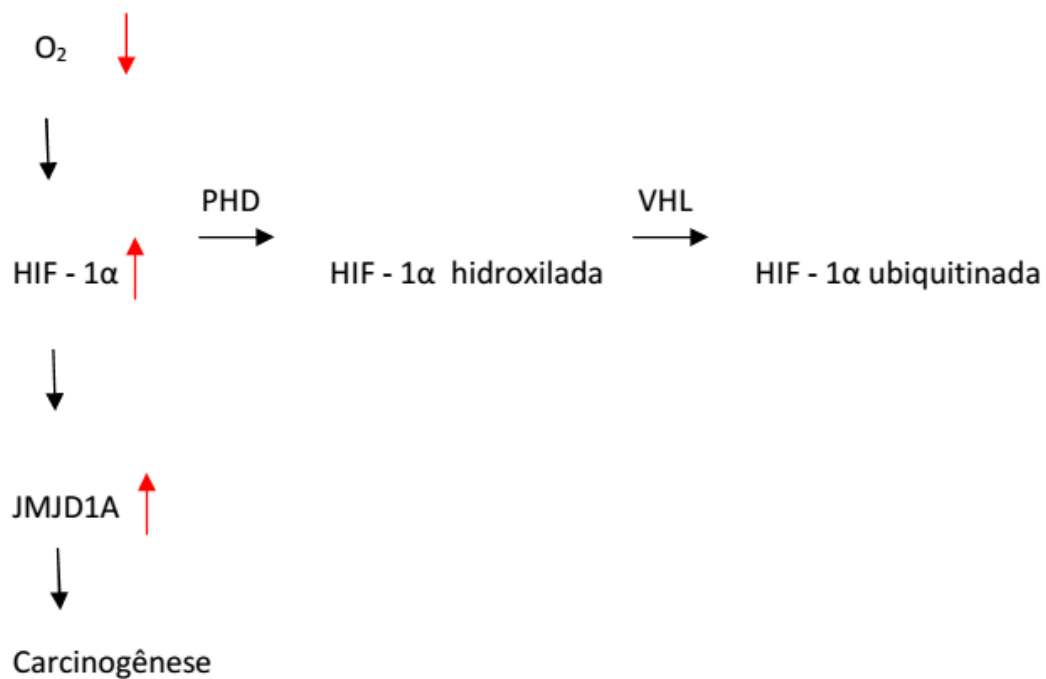


Figura 1: Provável modelo de regulação da JMJD1A pela hipóxia. Sob hipóxia, a HIF-1 α é hidroxilada pela *oxygen-dependent prolyl hydroxylase* (PHD), a qual direciona para a ubiquitinação pela proteína VHL e subsequente degradação proteossomal. Sob hipóxia a proteína HIF-1 α é estabilizada e aumenta a expressão dos genes de resposta a hipóxia incluindo a JMJD1A, os quais estimulam a carcinogênese.

1.3 JMJD1A

Quando as células estão sob hipóxia, mudanças epigenéticas ocorrem como mecanismo para fornecer sobrevivência à célula para que transponha as dificuldades geradas pelo ambiente nocivo. Epigenética são as mudanças da expressão gênica herdadas sem que ocorra alteração da sequência do DNA. Entre os diferentes tipos de mudanças epigenéticas as mais caracterizadas são a metilação do DNA e acetilação, desacetilação e metilação de histonas, ambas relacionadas a progressão tumoral (GAO *et al*, 2009).

O octâmero de histonas é formado por duas cópias de histonas H2A, H2B, H3 e H4. A cauda N-terminal da proteína se estende a partir do nucleossomo e forma sítios onde ocorre os processos de fosforilação, metilação, acetilação e ubiquitinação. Tais

modificações afetam a estrutura da cromatina e conseqüentemente a transcrição gênica. A acetilação das lisinas da histonas geralmente ativam a transcrição gênica, enquanto que a metilação das lisinas pode ter efeito diferente dependendo do *status* e a posição onde ocorre o processo. A metilação da lisina 4, lisina 36, lisina 79 na histona H3 usualmente resulta na ativação da transcrição, enquanto a metilação da lisina 9 e lisina 27 na histona H3 e lisina 20 na histona H4 geralmente é relacionada ao silenciamento gênico (GAO *et al.*, 2009).

A via da HIF regula muitas proteínas que facilitam a adaptação metabólica para suportar a hipóxia, como é o caso das proteínas pertencentes ao domínio Jumonji-C (JmjC). Dessas proteínas desmetilases de histonas, quatro (JMJD1A, JMJD2B, JMJD2C e JARID1B) são ativadas por meio da ligação dos elementos responsivos de hipóxia em suas regiões promotoras (VAVILALA *et al.*, 2012).

O gene JMJD1A, também conhecido por *JMJ C-domain-containing histone demethylase 2A* (JHDM2A ou KDM3A), realiza a desmetilação de histonas em resíduos de lisina e arginina em reação oxigênio dependente que necessita de íons Fe (II) e α -cetoglutarato como cofatores. Tem se discutido a possibilidade da JMJD1A conseguir catalizar a desmetilação em ambientes hipóxicos mesmo sendo o oxigênio um substrato essencial para a reação de desmetilação oxidativa (WELLMANN *et al.*, 2008).

Este gene é capaz de desmetilar as histonas H3 di ou mono-metilada na lisina 9 (H3K9me2 e H3K9me1). A metilação de histonas contribui para uma mudança na estrutura da cromatina que pode influenciar a expressão gênica, a replicação e o reparo do DNA. Em células tronco embrionárias, a JMJD1A está envolvida em manter a pluripotência impedindo que os promotores dos genes de diferenciação celular tenha a sua H3K9 dimetilada (LOH *et al.*, 2007).

A JMJD1A possui um importante papel no crescimento tumoral em microambiente hipóxico (Figura 2). A proteína é importante por facilitar a ativação de genes relacionados com a resposta a hipóxia, por meio da redução da metilação das H3K9 das regiões reguladoras dos genes alvos (KRIEG *et al.*, 2010)

Um nível baixo da JMJD1A resulta em uma baixa atividade desmetiladora e ineficiente ativação gênica. A indução da JMJD1A pela hipóxia pode aumentar a

atividade das desmetilases de histonas nos promotores de genes alvos, como por exemplo, ADM e GDF15, para compensar a redução do oxigênio durante a hipóxia. A regulação da JMJD1A ajuda a manter o fenótipo indiferenciado das células tumorais (Figura 2) (KRIEG *et al.*, 2010).

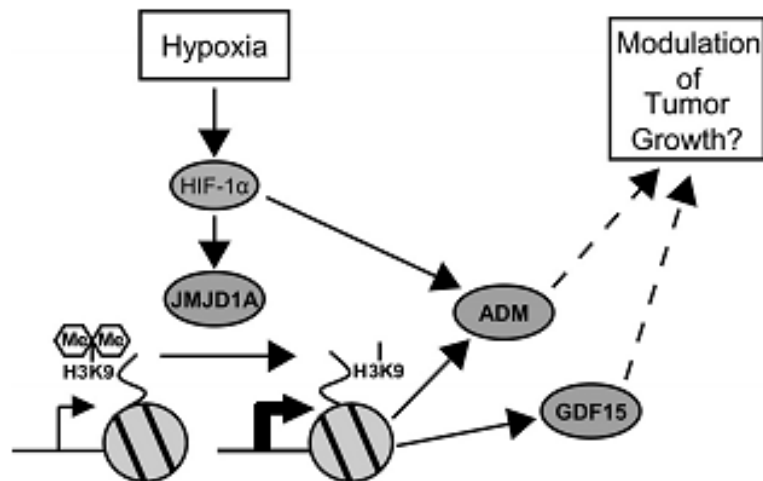


Figura 2: Modelo de ação da JMJD1A durante a hipóxia. Hipóxia celular estabiliza a HIF-1 α , a qual induz muitos genes, incluindo a JMJD1A. O aumento da expressão JMJD1A reduz o nível de metilação nos promotores de alguns genes específicos, como o ADM e GDF15, aumentando a expressão e possivelmente o controle do crescimento tumoral. Fonte: (KRIEG *et al.*, 2010).

A JMJD1A atua como um regulador pro-angiogênico que promove o início do crescimento tumoral (VAVILALA *et al.*, 2012). Acredita-se que a regulação epigenética sob situações de hipóxia e falta de nutrientes podem ser fatores essenciais para a agressividade tumoral e mudança no metabolismo das células neoplásicas. (OSAWA, *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013).

A metilação da H3K9 tem sido associada com repressão transcricional e formação de heterocromatina. Perda global de metilação da H3K9 foi observada em muitos tipos de câncer. Além disso, muitos tumores tem sido relacionados à perda da atividade de metiltransferase da H3K9. As proteínas da família JMJC, inclusive a JMJD1A são promissores alvos terapêuticos para o tratamento do câncer (LIM *et al.*, 2010).

A JMJD1A tem sido relacionada com o desenvolvimento e prognóstico de diversos tipos de tumores, tais como o câncer colorretal (UEMURA *et al.*, 2010), nasofaríngeo (DU *et al.*, 2011), hepatocelular (PARK *et al.*, 2013). Com relação ao

de câncer de cabeça e pescoço, trabalhos que relacionam a JMJD1A com o desenvolvimento e prognóstico da doença são raros na literatura. Dessa forma, o presente estudo visa relacionar a expressão da proteína JMJD1A com características clinicopatológicas, prognósticas e a sobrevida de pacientes com carcinoma oral e orofaringe.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação da expressão da proteína JMJD1A com características clinicopatológicas, prognósticas e com a sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral e orofaringe.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão por meio de imuno-histoquímica da JMJD1A em tecido tumoral em lâmina de *tissue microarray*;
- Comparar a expressão da JMJD1A entre o núcleo e citoplasma;
- Relacionar a expressão da JMJD1A com características clinicopatológicas;
- Correlacionar a expressão da JMJD1A com características prognósticas;
- Avaliar a influência da expressão JMJD1A na sobrevida livre de doença específica e doença local.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Heliópolis em 13 de Setembro de 2011, sob o número 818 e é subprojeto do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (Processo FAPESP no. 04/12054-9), também aprovado pelo CEP do Hospital Heliópolis sob o número 386 aprovado em 15 de abril de 2005 (Anexo 1).

O material utilizado para a realização do estudo consistiu de tecido parafinado que foi coletado e armazenado regularmente após o ato cirúrgico pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

Os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço e muitos foram a óbito dada a agressividade da doença.

3.2 Casuística

Para a realização da pesquisa, foram estudados 80 pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, tratados cirurgicamente no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, dentre o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005. Todos os casos têm confirmação histológica através de nova análise histopatológica e do diagnóstico, com seguimento mínimo de 24 meses a

partir do tratamento inicial, realizado de acordo com a rotina estabelecida pelo Serviço.

Para a uniformidade da casuística, foram excluídos os casos com tratamento prévio à cirurgia, tratamento pós operatório com quimioterapia ou com metástase à distância. Foram retirados os casos sem informações relevantes para o estudo ou representatividade das amostras para a análise histopatológica e imuno-histoquímica. Também foram excluídos os casos não submetidos ao esvaziamento de linfonodos cervicais ou que apresentaram margens tumorais comprometidas.

3.2.1 Caracterização da Casuística

Dos 80 pacientes analisados 68 eram homens e 12 eram mulheres com idade média de 54 anos e desvio padrão de $\pm 10,4$ (24-79). Dos casos 71% eram tabagistas e 55% etilistas (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização epidemiológica da casuística em relação ao gênero, idade e hábitos tabagista e etilista.

Características epidemiológicas	Casos	
	No.	(%)
Gênero		
Feminino	12	15,0
Masculino	68	85,0
Faixa etária, anos		
média 54,4 / desvio padrão $\pm 10,4$ (24-79)		
≤ 55 anos	42	52,5
> 55 anos	38	47,5
Hábito tabagista		
Não	23	28,8
Sim	57	71,2
Hábito etilista		
Não	36	45,0
Sim	44	55,0
Total	80	100,0

Em relação à localização do tumor, 60 (75%) casos foram de tumores da cavidade oral e 20 (25%) foram de orofaringe. O estadiamento IV do tumor foi encontrado em mais de 50% dos indivíduos. O tamanho do tumor, pT, apresentou uma distribuição na qual mais de 50% foram tumores pT3 e pT4. Em relação a presença de linfonodos aproximadamente 60% dos pacientes possuía linfonodos positivos (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização clínica da amostra em relação ao sítio, estadiamento, tamanho do tumor e linfonodos.

Características clínicas	Casos	
	No.	(%)
Sítio		
Cavidade oral	60	75,0
Orofaringe	20	25,0
Estadiamento		
Estádio I	3	3,8
Estádio II	16	20,0
Estádio III	20	25,0
Estádio IV	41	51,2
Tamanho do tumor (pT)		
pT1, pT2	33	41,2
pT3	19	23,8
pT4	28	35,0
Linfonodos (pN)		
Negativo	33	41,2
Positivo	47	58,8
Total	80	100,0

Os tumores foram bem ou moderadamente diferenciados em 90% dos casos. Dos casos analisados 66% apresentaram invasão linfática. A metade dos casos apresentou invasão perineural. O infiltrado inflamatório predominante foi o escasso ou moderado. A displasia foi leve ou moderada em aproximadamente 80% dos casos e em 67% dos indivíduos a necrose, esteve presente (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização histopatológica dos casos segundo o grau de diferenciação, infiltração linfática, invasão perineural, infiltrado inflamatório, desmoplasia e necrose.

Características histopatológicas	Casos	
	No.	(%)
Grau de diferenciação		
Bem	33	41,2
Moderadamente	39	48,8
Pouco	8	10,0
Infiltração linfática		
Ausente	27	33,8
Presente	53	66,2
Invasão perineural		
Ausente	40	50,0
Presente	40	50,0
Infiltrado inflamatório		
Escasso	33	41,3
Moderado	34	42,4
Intenso	13	16,3
Desmoplasia		
Leve	37	46,3
Moderado	26	32,4
Intenso	17	21,3
Necrose		
Ausente	13	16,2
Presente	67	83,8
Total	80	100,0

De todos os casos incluídos no estudo, 55 % foram tratados com radioterapia pós-operatória. A maioria dos pacientes apresentou recidiva geral, porém, 40% manifestou recidiva local. A taxa de óbito chegou a 52,5% durante o período de acompanhamento clínico.

Tabela 4: Caracterização do tratamento e prognóstico da casuística de acordo com a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, recidiva geral, recidiva local e óbito. (Continua na próxima)

Características do tratamento e prognóstico	Casos	
	No.	(%)
Radioterapia		
Não	36	45,0
Sim	44	55,0
Recidiva geral		
Não	27	33,8
Sim	51	63,8
Não avaliado	2	2,4

Tabela 4: Caracterização do tratamento e prognóstico da casuística de acordo com a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, recidiva geral, recidiva local e óbito. (Continua na primeira)

Recidiva local		
Não	46	57,5
Sim	32	40,0
Não avaliado	2	2,5
Óbito		
Não	30	37,5
Sim	42	52,5
Não avaliado	8	10,0
Total	80	100,0

3.3 Construção do TMA (*Tissue microarray*)

Para o melhor aproveitamento dos anticorpos e economia de material emblocado dos pacientes, foi montado um *tissue microarray* de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe.

Após a revisão das lâminas pela coloração de hematoxilina e eosina (H.E.) dos blocos selecionados, estas foram analisadas e duas áreas foram delimitadas com caneta apropriada para marcação (as áreas marcadas foram representativas do tumor). Posteriormente, foram delimitadas as áreas nos blocos de parafina, chamados de blocos doadores.

Dos blocos doadores foram retirados fragmentos cilíndricos de 1mm e estes acondicionados em um outro bloco chamado de bloco receptor. Cada bloco doador foi representado em duplicata no bloco receptor. Esta etapa foi realizada em aparelho "Tissue Arrayer" da marca Beecher Instruments® (Silver Spring MD), no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer São Paulo AC Camargo. Os casos foram previamente dispostos em ordem numérica crescente de acordo com o registro de prontuário da cabeça e pescoço do Hospital Heliópolis e amostrados em duplicata, segundo a figura 3.

Em seguida esses blocos foram levados ao micrótomo e obtidos cortes histológicos sequenciais de 3 μ que foram dispostos em lâminas com adesivos da marca Microsystems Inc®.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	Liver Core	2257	2434	2484	2500	2501	2512	2518	2544	2548	2576	3006	3008	3018	3020	3028	1
		CP2/0118	CP2/0003	CP2/0008	CP2/0010	CP2/0013	CP2/0015	CP2/0012	CP2/0018	CP2/0019	CP2/0023	CP2/0036	CP2/0029	CP2/0032	CP2/0039	CP2/0028	
2	3091	3124	3141	3147	3160	3186	3202	3249	3290	3292	3294	3335	3357	3364	3368	3412	2
	CP2/0040	CP2/0081	CP2/0047	CP2/0060	CP2/0074	CP2/0075	CP2/0071	CP2/0087	CP2/0099	CP2/0093	CP2/0094	CP2/0109	CP2/0114	CP2/0116	CP2/0115	CP2/0113	
3	3416	3431	3435	3444	3460	3474	3478	3498	3507	3541	3547	3557	3559	3563	3608	4062	3
	CP2/0120	CP2/0117	CP2/0121	CP2/0130	CP2/0125	CP2/0122	CP2/0152	CP2/0144	CP2/0132	CP2/0147	CP2/0133	CP2/0149	CP2/1030	CP2/0135	CP2/0165	CP2/0168	
4	4084	4088	4124	4135	4136	4144	4159	4160	4168	4179	4221	4239	4304	4392	4424	4435	4
	CP2/0169	CP2/0170	CP2/0166	CP2/1002	CP2/0195	CP2/0177	CP2/0181	CP2/0176	CP2/0182	CP2/0188	CP2/0185	CP2/0196	CP2/1003	CP2/1006	CP2/1010	CP2/1012	
5	4538	4441	4451	4469	4483	4538	4549	4553	4589	4649	4659	4686	5066	5073	5182	5215	5
	CP2/1033	CP2/1008	CP2/1022	CP2/1019	CP2/1021	CP2/1033	CP2/1032	CP2/1036	CP2/1031	CP2/1041	CP2/1043	CP2/1044	CP2/1050	CP2/1051	CP2/1076	CP2/1069	
6	5234	5248	5251	5266	5280	5295	5361	5375	5437	5509	5523	5557	5578	5633	5666	5695	6
	CP2/1065	CP2/1071	CP2/1074	CP2/1073	CP2/1080	CP2/1083	CP2/1089	CP2/1091	CP2/1099	CP2/1112	CP2/1104	CP2/1109	CP2/1111	CP2/1114	CP2/1120	CP2/1113	

Figura 3: Mapa do *tissue microarray*, mostrando a organização dos casos na lâmina.

3.4 Reação de imuno-histoquímica

A lâmina de TMA foi submetida à reação de imuno-histoquímica na qual foi utilizado o Kit da Spring Bioscience® (California, Estados Unidos, PMB1-250). A lâmina foi incubada por 45 minutos em solução de recuperação antigênica 3 em 1 pH 6. Após este tempo foi deixada em solução de EDTA (1mM, pH 8 - 9) por 10 minutos para bloqueio da reação de recuperação antigênica. Em seguida foi feito o bloqueio de peroxidase por 15 minutos através da utilização de uma câmara úmida. Novamente foram imersas em solução de EDTA por 5 minutos, processo este repetido por três vezes. Em seguida, procedeu-se o bloqueio de proteína por 15 minutos através da solução de bloqueio do kit. Após o bloqueio foi aplicado o anticorpo Anti – JMJD1A monoclonal (Estados Unidos, Abcam® – ab107234) diluído 1/400 em diluente de anticorpo e deixado sobre a lâmina por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo primário diluído as lâminas foram imersas em solução de EDTA por 5 minutos, etapa repetida por mais duas vezes e em seguida foi aplicada a solução de complemento por 10 minutos. Depois foi aplicada a solução de conjugado HRP que foi deixada por 15 minutos. As lâminas foram novamente imersas em solução de EDTA por 5 minutos, processo repetido por mais três vezes. Logo após, as lâminas foram submetidas por 10 minutos ao cromógeno DAB Plus diluído 1/50 em solução diluente de DAB e em seguida lavadas com água destilada, coradas com hematoxilina por 5 minutos e desidratadas na bateria de xilol e álcool.

Ao final de todas as etapas foi fixada a lamínula com resina.

3.5 Análise da expressão da proteína JMJD1A

A análise da lâmina foi feita através do microscópico óptico Zeiss® em aumento de 100x e 400x. A expressão da JMJD1A foi avaliada duas vezes de forma independente nos dois spots de cada paciente e os casos conflitantes reanalisados. Todas as análises foram confirmadas por um patologista.

A análise da expressão da proteína JMJD1A foi realizada através da avaliação da expressão da proteína no núcleo e no citoplasma. A análise foi realizada por meio de uma combinação de scores segundo trabalhos encontrados na literatura (SOINI *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2013).

Durante a análise os pacientes foram classificados de acordo com duas categorias, a de intensidade de coloração e porcentagem de células marcadas. A intensidade de coloração foi classificada como negativa (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3). A porcentagem de células marcadas foi dividida da seguinte forma: 1 (<10%); 2 (10≤50%) e 3 (>50%) de células marcadas.

O score final foi obtido através da multiplicação dos scores de intensidade de coloração e o score da porcentagem de células tumorais coradas. Ambos os scores foram multiplicados e o resultado foi utilizado para classificar a expressão da JMJD1A como negativa (0), positiva fraca (1-4) e positiva forte (>4).

3.6 Análise estatística

A margem de erro estipulada em menor que 5% foi adotada para confirmar a associação testada em nível matemático, de acordo com o teste de significância de Lilliefors (significância de $p < 0.05$).

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

A regressão logística multivariada foi utilizada para ajustar os valores do odds ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC 95%). Para este teste, foram selecionadas as variáveis que apresentaram o valor de $p < 0.05$ quando testada diante a característica em questão, em análise bivariada.

Para a análise da sobrevida foi calculado o intervalo de tempo (em meses) entre as datas de cirurgia e óbito de cada paciente ou do último retorno nos casos de sobreviventes.

Entretanto, o intervalo de tempo para as análises de sobrevidas livre de doença local e livre de doença regional foi calculado utilizando como ponto final as datas de recidiva local e recidiva regional, respectivamente, ou a data do último retorno nos casos assintomáticos. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier e o valor de p de Wilcoxon.

Posteriormente, o modelo Cox Proportional Hazards foi utilizado para a análise multivariada considerando as variáveis com $p < 0.05$.

Os cálculos matemáticos foram realizados com a utilização do programa Epi Info® v 3.4.3, 2007.

4. RESULTADOS

A expressão JMJD1A nuclear foi negativa em 27 (33.8 %) casos, positiva fraca em 31 (38.8 %) e positiva forte em 22 (27.5 %) casos. Já no citoplasma a JMJD1A apresentou expressão negativa em 11 (13.8 %) casos, em 63 (78.8 %) positiva fraca e em (7.5 %) 6 casos foi positiva forte (Tabela 5). Os padrões de coloração utilizados podem ser observados na figura 4. A expressão da JMJD1A apresentou um perfil diferente estatisticamente significante entre o núcleo e o citoplasma ($p < 0.001$).

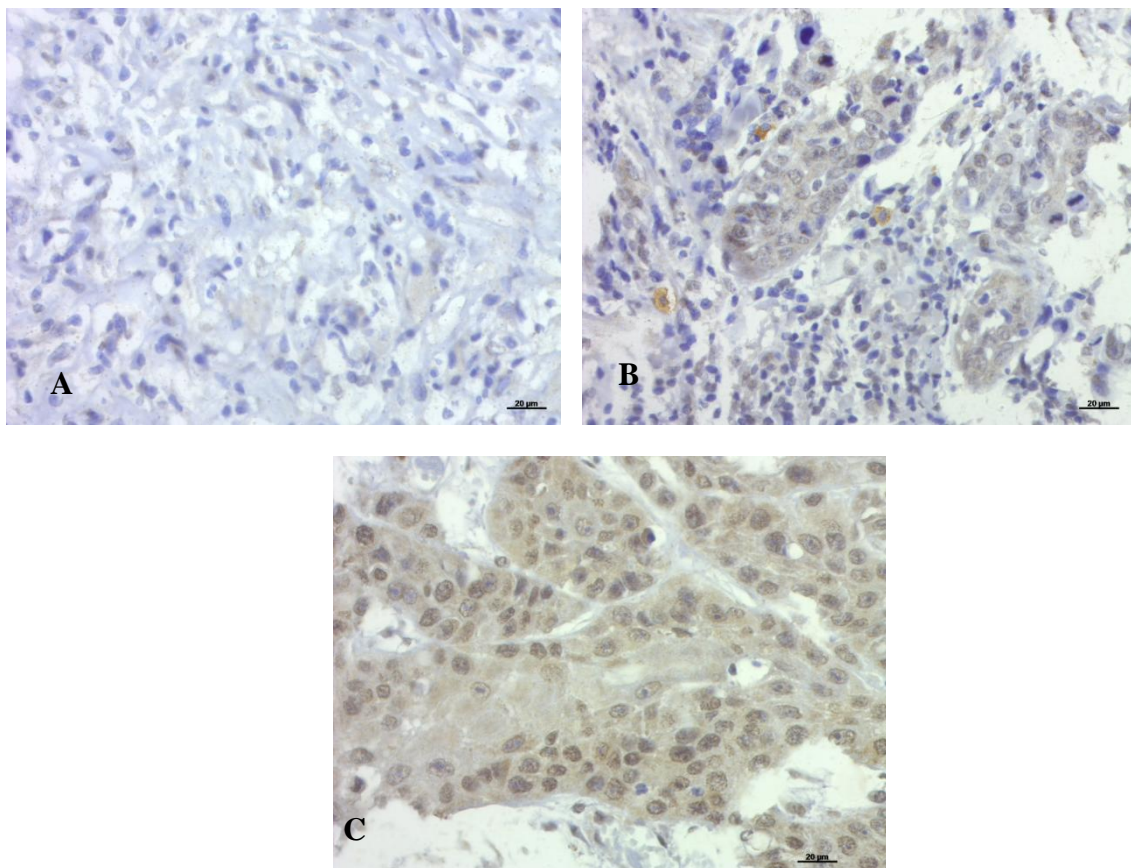


Figura 4: Fotos padronização JMJD1A. A: Núcleo- Negativo, Citoplasma – Negativo; B: Núcleo – Positivo fraco, Citoplasma – Positivo fraco; C: Núcleo – Positivo forte, Citoplasma – Positiva forte. Fotos tiradas em aumento de 400x em microscópio óptico.

Tabela 5: Comparação entre as expressões JMJD1A no núcleo e no citoplasma

Expressão JMJD1A	Localização				<i>p</i>
	Nuclear		Citoplasmática		
	No.	(%)	No.	(%)	
Negativo	27	33,8	11	13,8	< 0,001
Positiva fraca	31	38,8	63	78,8	
Positiva forte	22	27,5	6	7,5	
Total	80	100,0	80	100,0	

No trabalho, observamos que a positividade da expressão nuclear da JMJD1A não mostrou relação com as características clinicopatológicas, tais como o tamanho do tumor ($p=0.348$), grau de diferenciação ($p=0.972$), infiltração linfática ($p=0.345$), invasão perineural ($p=0.478$), infiltrado inflamatório ($p=0.228$), desmoplasia ($p=0.168$) e necrose ($p=0.094$). No entanto, a expressão positiva da proteína mostrou uma relação estatisticamente significativa com a presença de linfonodos acometidos ($p<0.001$), conforme pode ser observado na tabela 6.

O nível de expressão nuclear não mostrou relação significativa com as características clinicopatológicas analisadas, são elas o tamanho do tumor ($p=0.762$), linfonodos ($p=0.888$), grau de diferenciação ($p=0.992$), infiltração linfática ($p=0.318$), invasão perineural ($p=0.441$), infiltrado inflamatório ($p=0.663$), desmoplasia ($p=0.327$) e necrose ($p=0.194$) (Tabela 6).

Tabela 6: Análise da positividade e do nível de expressão nuclear JMJD1A segundo as características clinicopatológicas

Características clinicopatológicas	Expressão Nuclear JMJD1A								p	
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.		(%)
Tamanho do tumor (pT)										
pT1, pT2	14	51,9	19	35,8	0,348	12	38,7	7	31,8	0,762
pT3	6	22,2	13	24,5		8	25,8	5	22,7	
pT4	7	25,9	21	39,6		11	35,5	10	45,5	
Linfonodos (pN)										
Negativo	18	66,7	15	28,3	< 0,001	9	29,0	6	27,3	0,888
Positivo	9	33,3	38	71,7		22	71,0	16	72,7	
Grau de diferenciação										
Bem	11	40,7	22	41,5	0,972	13	41,9	9	40,9	0,992
Moderadamente	13	48,1	26	49,1		15	48,4	11	50,0	
Pouco	3	11,1	5	9,4		3	9,7	2	9,1	
Infiltração linfática										
Ausente	11	40,7	16	30,2	0,345	11	35,5	5	22,7	0,318
Presente	16	59,3	37	69,8		20	64,5	17	77,3	
Invasão perineural										
Ausente	15	55,6	25	47,2	0,478	16	51,6	9	40,9	0,441
Presente	12	44,4	28	52,8		15	48,4	13	59,1	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	13	48,1	20	37,7	0,228	12	38,7	8	36,4	0,693
Moderado	8	29,6	26	49,1		14	45,2	12	54,5	
Intenso	6	22,2	7	13,2		5	16,1	2	9,1	
Desmoplasia										
Leve	16	59,3	21	39,6	0,168	14	45,2	7	31,8	0,327
Moderado	8	29,6	18	34,0		8	25,8	10	45,5	
Intenso	3	11,1	14	26,4		9	29,0	5	22,7	
Necrose										
Ausente	7	25,9	6	11,3	0,094	5	16,1	1	4,5	0,194
Presente	20	74,1	47	88,7		26	83,9	21	95,5	
Total	27	33,8	53	66,3		31	58,5	22	41,5	

A positividade da expressão citoplasmática da JMJD1A mostrou relação com o tamanho do tumor ($p=0.023$), presença de linfonodos ($p < 0.001$) e infiltrado inflamatório ($p=0.001$). Contudo, o grau de diferenciação ($p=0.619$), a invasão linfática ($p=0.116$), invasão perineural ($p=0.258$), desmoplasia ($p=0.163$) e necrose ($p=0.569$) não tiveram relação com a positividade da expressão citoplasmática (Tabela 7).

O nível da expressão citoplasmática da JMJD1A não mostrou relação significativa com o tamanho do tumor ($p=0.432$), linfonodos ($p=0.341$), grau de diferenciação ($p=0.590$), infiltração linfática ($p=0.402$), invasão perineural ($p=0.080$), infiltrado inflamatório ($p=0.459$), desmoplasia ($p=0.356$) e necrose ($p=0.337$), como pode ser visualizado na tabela 7.

Tabela 7: Análise da positividade e do nível de expressão citoplasmática JMJD1A segundo as características clinicopatológicas

Características clinicopatológicas	Expressão Citoplasmática JMJD1a									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT)										
pT1, pT2	6	54,5	27	39,1	<u>0,023</u>	24	38,1	3	50,0	0,432
pT3	5	45,5	14	20,3		12	19,0	2	33,3	
pT4	0	0,0	28	40,6		27	42,9	1	16,7	
Linfonodos (pN)										
Negativo	10	90,9	23	33,3	<u><0,001</u>	22	34,9	1	16,7	0,341
Positivo	1	9,1	46	66,7		41	65,1	5	83,3	
Grau de diferenciação										
Bem	6	54,5	27	39,1	0,619	25	39,7	2	33,3	0,590
Moderadamente	4	36,4	35	50,7		31	49,2	4	66,7	
Pouco	1	9,1	7	10,1		7	11,1	0	0,0	
Infiltração linfática										
Ausente	6	54,5	21	30,4	0,116	20	31,7	1	16,7	0,402
Presente	5	45,5	48	69,6		43	68,3	5	83,3	
Invasão perineural										
Ausente	7	63,6	33	47,8	0,258	28	44,4	5	83,3	0,080
Presente	4	36,4	36	52,2		35	55,6	1	16,7	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	2	18,2	31	44,9	<u>0,001</u>	29	46,0	2	33,3	0,459
Moderado	3	27,3	31	44,9		27	42,9	4	66,7	
Intenso	6	54,5	7	10,1		7	11,1	0	0,0	
Desmoplasia										
Leve	8	72,7	29	42,0	0,163	26	41,3	3	50,0	0,356
Moderado	2	18,2	24	34,8		21	33,3	3	50,0	
Intenso	1	9,1	16	23,2		16	25,4	0	0,0	
Necrose										
Ausente	2	18,2	11	15,9	0,569	11	17,5	0	0,0	0,337
Presente	9	81,8	58	84,1		52	82,5	6	100,0	
Total	11	13,8	69	86,3		63	91,3	6	8,7	

Com relação a associação entre JMJD1A e metástase linfonodal, a análise multivariada mostrou que a expressão positiva nuclear e citoplasmática aumentam o risco desta metástase em cerca de 4 e 11 vezes, respectivamente, quando comparada com a negatividade da expressão. (OR=3.76; IC=1.21-11.74 e OR=11,46; IC=1.10-119,38, respectivamente; tabela 8).

A análise multivariada mostrou associação significativa entre o tamanho do tumor e os linfonodos, o tumor mais desenvolvido, pT4, aumenta a chance da presença positiva de linfonodos acometidos em aproximadamente 4 vezes (OR=3.77; IC=1,06-13,41; tabela 8).

Tabela 8: Análise multivariada da relação da positividade expressão nuclear e citoplasmática da JMJD1A com *status* linfonodal.

Variáveis	Linfonodos	
	OR (IC 95%)	p
Expressão Nuclear JMJD1A		
Negativo	1	
Positivo	<u>3,76 (1,21-11,74)</u>	<u>0,022</u>
Expressão Citoplasmática JMJD1A		
Negativo	1	
Positivo	<u>11,46 (1,10-119,38)</u>	<u>0,041</u>
Tamanho do tumor (pT)		
pT1, pT2	1	
pT3	2,93 (0,68-12,64)	0,151
pT4	<u>3,77 (1,06-13,41)</u>	<u>0,041</u>
Grau de diferenciação		
Bem	1	
Moderadamente	1,76 (0,56-5,59)	0,337
Pouco	<u>3,11 (0,34-28,06)</u>	<u>0,312</u>

A positividade da expressão nuclear JMJD1A não mostrou associação com a recidiva local (p=0.970, recidiva geral (p=0.408), óbito (p=0.830), como pode ser observado na tabela 9.

O nível de expressão nuclear JMJD1A não mostrou relação com a recidiva local (p=0.655) mas foi significativamente relacionada com a recidiva geral (p=0.040; tabela 9). A análise multivariada apresentou a expressão nuclear forte como fator que aumenta o risco desta recidiva em mais de cinco vezes, comparada a expressão fraca (OR=5.09; IC=1.11-23.38; tabela 10). A forte expressão nuclear JMJD1A foi relativamente baixa nos casos sobreviventes da doença, contudo, sem significância

estatística ($p=0.061$; tabela 9). Entretanto, a análise multivariada apontou a expressão nuclear forte como fator que aumenta em mais de 4 vezes o risco de óbito comparada a expressão fraca ($OR=4.67$; $IC=1.12-19.48$; tabela 10).

Tabela 9: Análise da positividade e do nível de expressão nuclear JMJD1A segundo as características prognósticas.

Características prognósticas	Expressão Nuclear JMJD1A								<i>p</i>		
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>	
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.			(%)
Recidiva geral											
Não	11	40,7	16	30,2	0,408	13	41,9	3	13,6	<u>0,040</u>	
Sim	16	59,3	35	66,0		18	58,1	17	77,3		
Não avaliado	0	0,0	2	3,8		0	0,0	2	9,1		
Recidiva local											
Não	16	59,3	30	56,6	0,970	19	61,3	11	50,0	0,655	
Sim	11	40,7	21	39,6		12	38,7	9	40,9		
Não avaliado	0	0,0	2	3,8		0	0,0	2	9,1		
Óbito											
Não	13	48,1	29	54,7	0,830	14	45,2	5	22,7	0,061	
Sim	10	37,0	20	37,7		15	48,4	15	68,2		
Não avaliado	4	14,8	4	7,5		2	6,5	2	9,1		
Total	27	33,8	53	66,3		31	58,5	22	41,5		

Tabela 10: Análise multivariada da relação do nível de expressão nuclear JMJD1A com recidiva e óbito.

Variáveis	Recidiva geral		Óbito	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Expressão Nuclear JMJD1A				
Fraca	1		1	
Forte	<u>5,09 (1,11-23,38)</u>	<u>0,036</u>	<u>4,67 (1,12-19,48)</u>	<u>0,035</u>
Estadiamento				
I, II	1		1	
III	2,50 (0,35-17,91)	0,362	5,72 (0,73-45,00)	0,098
IV	3,37 (0,60-19,11)	0,170	6,12 (1,02-36,84)	<u>0,048</u>

A positividade da expressão citoplasmática da JMJD1A não mostrou relação com a recidiva geral ($p=0.414$), recidiva local ($p=0.255$) e óbito ($p=0.434$). O nível de expressão citoplasmática da JMJD1A também não obteve associação significativa com a recidiva geral ($p=0.081$), recidiva local ($p=0.526$) e óbito ($p=0.178$), como pode ser observado na tabela 11.

Tabela 11: Análise da positividade e do nível de expressão citoplasmática JMJD1A segundo as características prognósticas.

Características prognósticas	Expressão Citoplasmática JMJD1A									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	5	45,5	22	31,9	0,414	22	34,9	0	0,0	0,081
Sim	6	54,5	45	65,2		39	61,9	6	100,0	
Não avaliado	0	0,0	2	2,9		2	3,2	0	0,0	
Recidiva local										
Não	8	72,7	38	55,1	0,255	35	55,6	3	50,0	0,526
Sim	3	27,3	29	42,0		26	41,3	3	50,0	
Não avaliado	0	0,0	2	2,9		2	3,2	0	0,0	
Óbito										
Não	6	54,5	36	52,2	0,434	31	49,2	5	83,3	0,178
Sim	3	27,3	27	39,1		26	41,3	1	16,7	
Não avaliado	2	18,2	6	8,7		6	9,5	0	0,0	
Total	11	13,8	69	86,3		63	91,3	6	8,7	

A positividade da expressão nuclear JMJD1A não mostrou significância com a sobrevida livre de doença ($p=0.902$; figura 5-A), sobrevida livre de doença local ($p=0.762$; figura 5-B) e sobrevida doença específica ($p=0.959$, figura 5-C).

O nível da expressão nuclear JMJD1A não mostrou significância com a sobrevida livre de doença ($p=0.172$; figura 5-D) e sobrevida livre de doença local ($p=0.554$; figura 5-E). Com relação a sobrevida doença específica, cerca de 60% dos pacientes com expressão forte morreram, enquanto que para o mesmo período pouco mais de 30% dos pacientes com expressão fraca morreram ($p=0.052$, figura 5-F). A análise multivariada apontou a expressão nuclear forte como fator que aumenta o risco da precocidade do óbito em mais de duas vezes, quando comparada a fraca expressão (HR=2.56; IC=1.21-5.41; tabela 12).

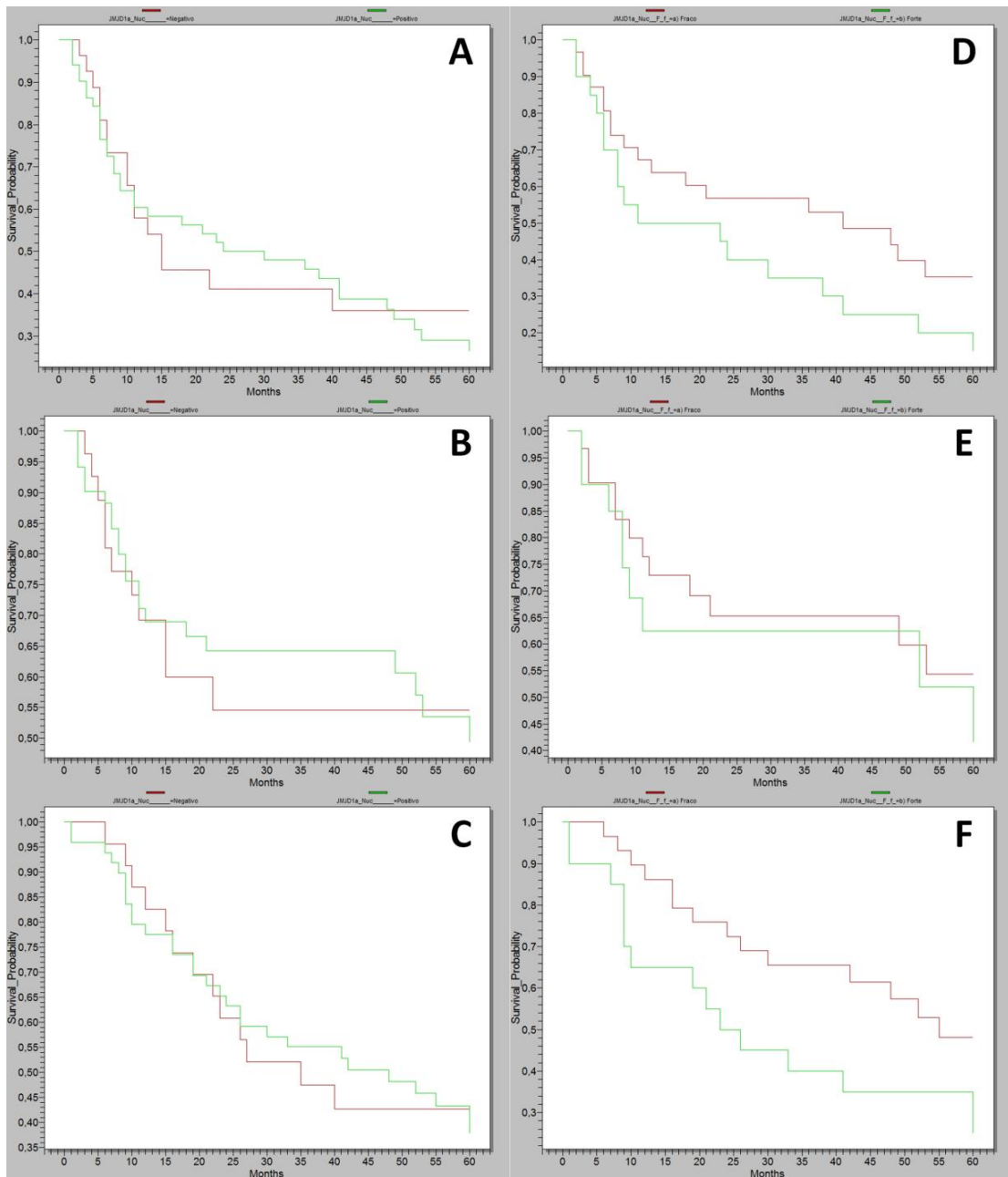


FIGURA 5: Sobrevidas da positividade e nível de expressão JMJD1A nuclear. A: Sobrevida livre de doença segundo a positividade de expressão JMJD1A nuclear. B: Sobrevida livre de doença local segundo a positividade de expressão JMJD1A nuclear. C: Sobrevida doença específica de acordo com a positividade de expressão JMJD1A nuclear. D: Sobrevida livre de doença segundo o nível de expressão JMJD1A nuclear. E: Sobrevida livre de doença local segundo o nível de expressão JMJD1A nuclear. F: Sobrevida doença específica segundo o nível de expressão JMJD1A nuclear. Nas curvas A, B e C as linhas vermelha e verde correspondem a expressão negativa e positiva da JMJD1A no núcleo, respectivamente. Já nas curvas D, E e F as linhas vermelha e verde correspondem a expressão fraca e forte da JMJD1A no núcleo, respectivamente.

Tabela 12: Análise multivariada da relação do nível de expressão nuclear JMJD1A com sobrevida doença específica.

Variáveis	Sobrevida Doença Específica	
	HR (IC 95%)	p
Expressão Nuclear JMJD1A		
Fraca	1	
Forte	<u>2,56 (1,21-5,41)</u>	<u>0,014</u>
Estadiamento		
I, II	1	
III	3,24 (0,82-12,82)	0,094
IV	<u>4,42 (1,27-15,44)</u>	<u>0,020</u>

A positividade da expressão citoplasmática JMJD1A não mostrou significância com a sobrevida livre de doença ($p=0.505$; figura 6-A), sobrevida livre de doença local ($p=0.222$; figura 6-B) e sobrevida doença específica ($p=0.670$, figura 6-C). O nível de expressão citoplasmática JMJD1A também não mostrou significância com a sobrevida livre de doença ($p=0.150$; figura 6-D), sobrevida livre de doença local ($p=0.688$; figura 6-E) e sobrevida doença específica ($p=0.159$, figura 6-F).

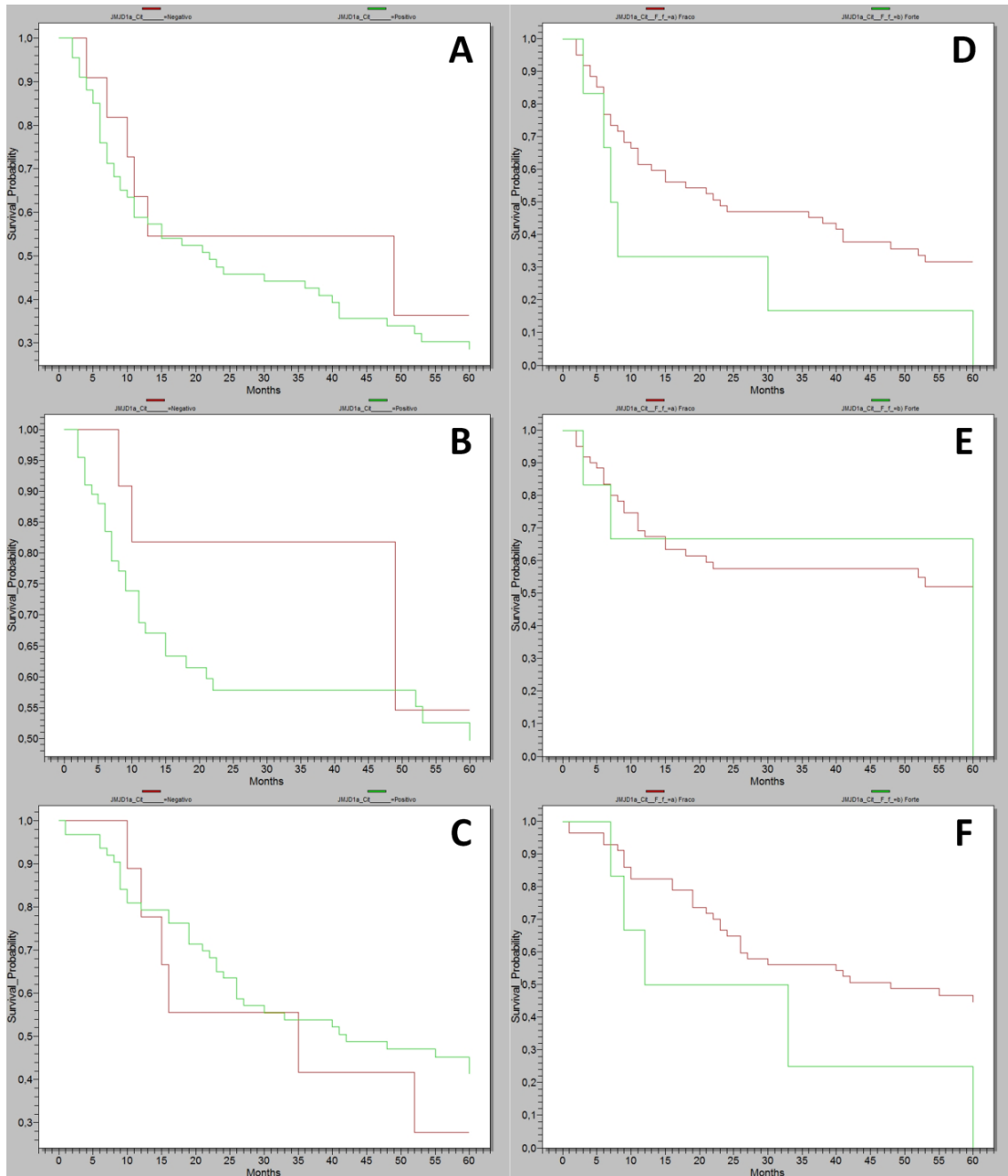


FIGURA 6: Sobrevidas da positividade e nível de expressão JMJD1A citoplasmática. A: Sobrevida livre de doença segundo a positividade de expressão JMJD1A citoplasmática. B: Sobrevida livre de doença local segundo a positividade de expressão JMJD1A citoplasmática. C: Sobrevida doença específica de acordo com a positividade de expressão JMJD1A citoplasmática. D: Sobrevida livre de doença segundo o nível de expressão JMJD1A citoplasmática. E: Sobrevida livre de doença local segundo o nível de expressão JMJD1A citoplasmática. F: Sobrevida doença específica segundo o nível de expressão JMJD1A citoplasmática. Nas curvas A, B e C as linhas vermelha e verde correspondem a expressão negativa e positiva da JMJD1A no citoplasma, respectivamente. Já nas curvas D, E e F as linhas vermelha e verde correspondem a expressão fraca e forte da JMJD1A no citoplasma, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A expressão da JMJD1A entre o núcleo e citoplasma mostrou um padrão diferente estatisticamente significante. O que chama a atenção é que JMJD1A é um regulador epigenético do DNA realizando a desmetilação da histona H3 lisina 9, sendo assim seria esperado apenas uma concentração nuclear da proteína. No entanto, assim como o presente estudo o trabalho de Yamada *et al.* (2012) também observou a expressão da proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma, 22 amostras das 26 com expressão nuclear positiva para JMJD1A, mostraram expressão da proteína também no citoplasma. Da mesma forma o estudo de Sar *et al.* (2009) observou que a JMJD1A não é exclusivamente uma proteína nuclear, ocorrendo também no citoplasma. Os autores observaram uma transição da JMJD1A do citoplasma para o núcleo quando as células estavam sob a condição de hipóxia.

No estudo de Okada *et al.* (2007) eles observaram que em algumas situações a JMJD1A pode se localizar também no citoplasma, como acontece com as espermatídes quando começam a se alongar, a proteína se localiza no citoplasma e forma aglomerados, estes permanecem até a espermiogênese (fase final da espermatogênese) e desaparecem no espermatozóide maduro.

No trabalho observamos que a expressão JMJD1A no núcleo e citoplasma está relacionada a presença positiva de linfonodos acometidos. A análise multivariada mostrou que a expressão forte da JMJD1A no núcleo aumenta o risco em aproximadamente 4 vezes de metástase linfonodal, enquanto que a expressão forte da proteína no citoplasma aumenta a chance em mais de 11 vezes. Da mesma forma que o presente estudo o trabalho de Uemura *et al.* (2010) também observou relação significativa entre a expressão JMJD1A e a metástase linfonodal. No estudo citado a análise multivariada encontrou que a expressão alta da JMJD1A aumenta o risco em mais de 6 vezes em ter linfonodos acometidos.

Da mesma forma o trabalho de Du *et al.* (2011) também encontrou uma relação significativa entre a expressão JMJD1A e a presença de linfonodos acometidos.

Os linfonodos ainda mostraram relação significativa com o tamanho do tumor, o tumor mais desenvolvido aumenta a chance de linfonodos positivos em aproximadamente 4 vezes. O presente estudo acredita que um tumor com uma vasta extensão teria um maior chance de se tornar hipóxico, com falta de oxigênio e de nutrientes, para fugir desta situação inóspita algumas células se soltariam do tumor e migrariam para outras regiões em busca de condições melhores de sobrevivência, essa migração de células tumorais levaria o acometimento dos linfonodos. Esta teoria pode ser embasada nos trabalhos de Osawa *et al.* (2013) e Park *et al.* (2013) que relatam que em situações de hipóxia e falta de nutrientes as células tumorais modificam o metabolismo e se tornam mais agressivas.

A positividade da expressão JMJD1A no citoplasma ainda mostrou associação significativa com o tamanho do tumor e com o infiltrado inflamatório.

Segundo Osawa *et al.* (2013), a JMJD1A tem a capacidade de modificar o microambiente tumoral por afetar a angiogênese e as células tumorais associadas a monócitos e macrófagos. A inibição da JMJD1A reduz significamente a angiogênese tumoral e a infiltração dos macrófagos dentro do tumor.

De acordo com o trabalho de Brigati *et al* (2010) ocorre um circuito vicioso entre a hipóxia e a inflamação. O processo de inflamação leva a ocorrência da hipóxia devido ao alto consumo de oxigênio pelo patógeno e pelas primeiras células de defesa do sistema inflamatório. Entretanto, o que é mais interessante é que a hipóxia também tem a capacidade de estimular o processo inflamatório por meio da ativação e regulação do infiltrado celular, cujas células principais são os macrófagos que respondem prontamente aos estímulos, como por exemplo, as infecções. Os macrófagos induzem uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios, tais como MIF, TNF, IL-6, IL-10, e a HIF-1.

Dessa forma, a inflamação ao ativar a HIF conseqüentemente estaria ativando a JMJD1A, então podemos supor uma relação significativa entre a inflamação com a expressão da JMJD1A como foi visualizada no presente estudo o qual observou uma associação significativa entre a expressão da proteína no citoplasma com o infiltrado inflamatório.

O estudo de Kim *et al.* (2012) relata que a indução por hipóxia da proteína JMJD2B, membro da família Jumonji C (JmjC) das histonas desmetilases, possui a capacidade de regular expressão da ciclina A1(CCNA1), desse modo ela influencia o crescimento de células de câncer gástrico. O estudo mostra que a família JmjC exerce um importante papel na regulação do crescimento das células tumorais em resposta a condição de hipóxia. Krieg *et al.* (2012) mostra em seu estudo que a expressão da adrenomedulina (ADM) é regulada pela JMJD1A sob hipóxia em células de câncer de colon, o estudo mostra ainda que ADM estimula o crescimento das células tumorais.

Park *et al.* (2013) observaram que as células de câncer de mama e hepatocelular tiveram um crescimento diferencial regulado pela hipóxia. Outro ponto observado e já bem discutido pela literatura é o aumento da expressão da JMJD1A em condições de hipóxia. O estudo citado acredita que a JMJD1A pode ter um importante papel na proliferação celular por meio da regulação da ação da ADM. A ADM é altamente expressa em varios tipos de câncer, incluindo carcinoma de pulmão, colorretal, glioblastoma, tendo sua expressão aumentada em condições de hipóxia por meio da ação da HIF-1. O trabalho relata que a ADM tem um importante papel no crescimento tumoral e na sobrevivência celular. Em um estudo com células tratadas com ADM ocorria a inibição da morte das células de adenocarcinoma endometrial sob condições de hipóxia, além disso acontecia uma maior expressão do Bcl2 o qual era apontando ser responsável pela inibição da morte celular.

O trabalho acima citado realizou um estudo *in vivo* que mostrou que a redução significativa da atividade da JMJD1A reduz a tumorigenicidade de células de carcinoma hepatocelular. Estes resultados suportam fortemente a idéia que a JMJD1A teria um papel importante no crescimento das células de câncer hepatocelular em condições de hipóxia (PARK *et al.*, 2013). O autor defende a possibilidade da JMJD1A se tornar um importante alvo terapêutico no tratamento para evitar o crescimento e desenvolvimento de células tumorais.

O estudo de Cho *et al.* (2012) observou uma relação significativa entre a expressão JMJD1A e o crescimento de células tumorais. A proliferação das células se dá pela estimulação do gene CCND1 pelo HOXA1, gene alvo da JMJD1A. O CCND1 ativa o aumento da proliferação celular e da sobrevivência celular. O estudo também

observou uma associação entre a expressão JMJD1A com a regulação do ciclo celular. A baixa expressão da JMJD1A resulta na baixa expressão do gene HOXA1 que leva a supressão da atividade do gene CCDN1 levando a parada do processo de divisão das células neoplásicas.

O estudo de Du *et al.* (2013) diz que a perda de JMJD1A é suficiente para reduzir o crescimento do tumor de carcinoma renal e de células de carcinoma de cólon *in vivo*, sugerindo que o função de JMJD1A em diferentes células e tecidos dependem do microambiente celular (Du *et al.*, 2011).

Os trabalhos supracitados vem corroborar com os dados obtidos no presente estudo o qual encontrou uma relação significativa entre a expressão da JMJD1A e o tamanho do tumor.

No trabalho encontramos uma relação significativa entre o nível da expressão JMJD1A nuclear com a recidiva geral e óbito. Yamada *et al.* (2012) observaram que indivíduos com carcinoma hepatocelular que possuíam a expressão alta da proteína JMJD1A tinham mais ocorrência de recidiva quando comparados aos indivíduos que tinha a expressão baixa da proteína.

Osawa *et al.* (2013) encontraram que a desmetisade de histona JMJD1A é um regulador epigenético esencial para a progressão tumoral sob condições de hipóxia e falta de nutrientes. A expressão da JMJD1A pode ser marcador de pior prognóstico para pacientes com câncer. Perda da JMJD1A resulta em um redução da proliferação e da invasibilidade de células humanas de câncer de colon cultivadas *in vitro*, que pode levar a redução do crescimento do tumor *in vivo*. Sendo assim, de acordo com este e outros trabalhos já citados podemos observar que a JMJD1A tem uma importante influencia no prognóstico dos pacientes e consequentemente na taxa de óbito.

Beyer *et al.* (2008) observa em seu trabalho que a HIF exerce uma importante influência na definição do fenótipo tumoral, por meio da regulação de processos como glicólise e angiogênese. O trabalho diz que a HIF tem a capacidade de induzir genes que promovem o crescimento e a invasão tumoral, metástase e a desdiferenciação do fenótipo das células tumorais. Segundo o trabalho a expressão da HIF e de seus genes alvos, como a JMJD1A, podem servir como marcadores de

prognóstico desfavorável para pacientes com câncer. O trabalho diz que a HIF influencia a diferenciação celular durante a embriogênese e promove a adoção de propriedades de células tronco em células tumorais, eles acreditam que isso ocorre em parte pela ação da JMJD1A que ativa o gene Oct4, o qual é associado com o fenótipo indiferenciado das células neoplásicas

Uemura *et al.* (2010) reportaram pela primeira vez que a JMJD1A pode ser considerada um importante marcador de prognóstico para pacientes com câncer colorrectal. Eles observaram que em microambientes cronicamente hipoxicos as células neoplásicas sofrem alterações genéticas e adaptativas que lhes permitem tornar-se mais agressivas clinicamente e de desenvolver resistência à irradiação e quimioterapia. Os autores observaram que os indivíduos que tinham a expressão alta da JMJD1A e que faziam quimioterapia tinham um pior prognóstico comparado aqueles que não faziam. Os resultados do trabalho mostraram que a JMJD1A pode diminuir a eficácia da quimioterapia, o que é consistente com o conceito de que a hipóxia frequentemente torna as células tumorais resistentes à quimioterapia. O autores ainda sugerem que a JMJD1A pode ser um marcador de pior prognóstico não só para casos de câncer colorretal mas também para outros tipos de tumores (Umera *et al.*, 2010).

Outro resultado encontrado pelo estudo foi a relação entre a sobrevida doença específica e o nível de expressão JMJD1A nuclear e o estadiamento do tumoral.

De acordo com os trabalhos de Uemura *et al.* (2010), Beyer *et al.* (2008) e Osawa *et al.* (2013) a JMJD1A é um marcador de pior prognóstico pois está relacionado a ativação de vários genes relacionados a um fenótipo tumoral desfavorável para o indivíduo, como por exemplo genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento do tumor e restistência ao tratamento. Já o estadiamento mais avançado do tumor aumenta a chance de ocorrência de metastástase, reduzindo assim a expectativa de vida dos indivíduos acometidos. Sendo assim, é esperado que a expressão da mesma forma que o grau de estadiamento do tumor tenham relação com a sobrevida doença específica, onde os pacientes com o tumor mais desenvolvido e a expressão forte da proteína tem uma maior chance de morrer de forma mais precoce por causa dos tumores de cabeça e pescoço.

Além disso, Uemura *et al* (2010) encontraram uma associação significativa entre a expressão alta da JMJD1A com sobrevida relacionada a câncer.

6. CONCLUSÃO

A JMJD1A mostrou um padrão diferencial de expressão entre o núcleo e citoplasma. A positividade de expressão da proteína no núcleo mostrou relação com a presença de linfonodos. No entanto, não mostrou associação com as demais características clinicopatológicas. A positividade da expressão JMJD1A não teve relação com as características prognósticas. Porém, o nível de expressão JMJD1A nuclear mostrou está relacionada com a recidiva geral.

A positividade da expressão JMJD1A no citoplasma demonstrou significância com a presença de linfonodos, com o infiltrado inflamatório e com o tamanho do tumor. Entretanto, em relação as características prognósticas a positividade de expressssão não mostrou associação com nenhuma analisada. O nível da expressão JMJD1A citoplasmática não mostrou relação significativa com nenhuma característica clinicopatológica e prognóstica.

Além da expressão da JMJD1A no núcleo e citoplasma os linfonodos também tiveram associação com o tamanho do tumor.

A análise multivarida mostrou que a recidiva geral e o óbito tem uma associação significativa com a positividade da expressão da proteína no núcleo. O óbito ainda mostrou relação com o estadiamento do tumor.

A sobrevida doença específica mostrou associação com o nível de expressão JMJD1A no núcleo e o estadiamento do tumor.

A JMJD1A se mostrou como uma promissora proteína a ser validada e utilizada na rotina como marcador de prognóstico para pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society; 2009.

BEYER, S., KRISTENSEN, M. M., JENSEN, K. S., JOHANSEN, J. V., & STALLER, P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *Journal of Biological Chemistry*. v. 283, n. 52, p. 36542-36552, 2008.

BRIGATI, C., BANELLI, B., DI VINCI, A., CASCIANO, I., ALLEMANNI, G., FORLANI, A. & ROMANI, M. Inflammation, HIF-1, and the epigenetics that follows. *Mediators of inflammation*. v. 2010, 2010.

CAMPOS A.H., ALDRED V.L., RIBEIRO K.C., VASSALLO J., SOARES F.A. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. *Mol Cell Biochem*. v.321, n.1-2, p. 95-102, 2009.

CHEN, H., & COSTA, M. Iron-and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. *Biometals*. v. 22, n. 1, p. 191-196, 2009.

CHO, H. S., TOYOKAWA, G., DAIGO, Y., HAYAMI, S., MASUDA, K., IKAWA, N. & HAMAMOTO, R. The JmJc domain-containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene. *International Journal of Cancer*, v. 131, n. 3, p. E179-E189, 2012.

DEDIVITIS R.A., FRANÇA C.M., MAFRA A.C.B, GUIMARÃES F.T, GUIMARÃES A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringologia*. v.70, p.35-40, 2004.

DOBROSSY L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev*. v..24, p.9-17, 2005.

DU, Z. M., HU, L. F., WANG, H. Y., YAN, L. X., ZENG, Y. X., SHAO, J. Y., & ERNBERG, I. Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A. *PLoS One*, v. 6, n. 4, p. e19137, 2011.

GAO, L., ALUMKAL, J. Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Epigenetics*, v. 5, n. 2, p. 100-104, 2010.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncology*, v. 9, n. 11, p. 1623-1636, 2013.

GUO, X., LU, J., WANG, Y., GUI, Y., DUAN, X., & CAI, Z. Ascorbate antagonizes nickel ion to regulate JMJD1A expression in kidney cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, v. 44, n. 4, p. 330-338, 2012.

HECK J.E., BERTHILLER J., VACCARELLA S ET AL. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*; v. 39, p. 166 –181, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ISA, A. Y., WARD, T. H., WEST, C. M., SLEVIN, N. J., & HOMER, J. J. Hypoxia in head and neck cancer. *The British Journal of Radiology*, v.79, p.791-798, 2014.

KIM, J. G., YI, J. M., PARK, S. J., KIM, J. S., T. G., YANG, K., & HEO, K. Histone demethylase JMJD2B-mediated cell proliferation regulated by hypoxia and radiation in gastric cancer cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012.

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

LEEMANS, C. R., BRAAKHUIS, B. J., & BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.

LIM, S., METZGER, E., SCHÜLE, R., KIRFEL, J., & BUETTNER, R. Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases. *International Journal of Cancer*, v. 127, n. 9, p. 1991-1998, 2010.

LOH, Y. H., ZHANG, W., CHEN, X., GEORGE, J., & NG, H. H. JMJD1A and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes & development*, v. 21, n. 20, p. 2545-2557, 2007.

MAILLOT, F.; FARAD, S.; LAMISSE, F. Alcohol et nutrition. *Pathologie Biologie*, v. 49, n. 9, p. 683-688, 2001.

MELSTROM, L. G., SALABAT, M. R., DING, X. Z., STROUCH, M. J., GRIPPO, P. J., MIRZOEVA, S., PELLING, J.C., BENTREM, D. J. Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1 α , GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*, v. 167, n. 2, p. 173-181, 2011.

OGDEN, G.R. Alcohol and cancer. *Alcohol*, v. 35, n.3, p.169-73, 2005.

OKADA Y, SCOTT G, RAY MK, MISHINA Y, ZHANG Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*, v.450, p. 119–123, 2007.

- OSAWA, T., TSUCHIDA, R., MURAMATSU, M., SHIMAMURA, T., WANG, F., SUEHIRO, J. I. & SHIBUYA, M. Inhibition of Histone Demethylase JMJD1A Improves Anti-Angiogenic Therapy and Reduces Tumor-Associated Macrophages. *Cancer research*, v. 73, n. 10, p. 3019-3028, 2013.
- PARK, S. J., KIM, J. G., SON, T. G., YI, J. M., KIM, N. D., YANG, K., & HEO, K. The histone demethylase JMJD1A regulates adrenomedullin-mediated cell proliferation in hepatocellular carcinoma under hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications*, 2013.
- PINHEIRO, C., SOUSA, B., ALBERGARIA, A., PAREDES, J., DUFLOTH, R., VIEIRA, D., SCHMITT, F., BALTAZAR, F. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. 2011.
- DOS SANTOS, M., DA CUNHA MERCANTE, A. M., LOURO, I. D., GONCALVES, A. J., DE CARVALHO, M. B., DA SILVA, E. H. T., & DA SILVA, A. M. Á. HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e45228, 2012.
- SAR, A., PONJEVIC, D., NGUYEN, M., BOX, A. H., & DEMETRICK, D. J. Identification and characterization of demethylase JMJD1A as a gene upregulated in the human cellular response to hypoxia. *Cell and tissue research*, v. 337, n. 2, p. 223-234, 2009.
- SCHANTZ, S.P.; HUANG, Q., SHAH, K., MURTY, V.V., HSU T.C., YU G., ANDERSEN P.E., HUVOS A.G., CHAGANTI R.S. Mutagen sensitivity and environmental exposures as contributing causes of chromosome 3p losses in head and neck cancers. *Carcinogenesis*. v.21,p. 1239–1246, 2000.
- SEITZ, H. K. & BECKER, P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Research and Health*, v. 30, n. 1, p. 38, 2007.
- SEMENZA, G. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, v. 148, n. 3, p. 399-408, 2012.
- SEMENZA, G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, n. 0, 2013.
- SOBIN, LESLIE H.; GOSPODAROWICZ, MARY K.; WITTEKIND, CHRISTIAN (Ed.). *TNM classification of malignant tumours*. Wiley. com, 2011.
- SOINI, Y., KAHLOS, K., PUHAKKA, A., LAKARI, E., SÄILY, M., PÄÄKKÖ, P., & KINNULA, V. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Brit J Cancer*. v.3, n.7, p. 880–886, 2000.
- STRANSKY, N., EGLOFF, A. M., TWARD, A. D., KOSTIC, A. D., CIBULSKIS, K., SIVACHENKO, A. & GRANDIS, J. R. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, v. 333, n. 6046, p. 1157-1160, 2011.
- UEMURA, M., YAMAMOTO, H., TAKEMASA, I., MIMORI, K., HEMMI, H., MIZUSHIMA, T., & MORI, M. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic

marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clinical Cancer Research*, v. 16, n. 18, p. 4636-4646, 2010.

VAVILALA, D. T., PONNALURI, V. K., VADLAPATLA, R. K., PAL, D., MITRA, A. K., & MUKHERJI, M. Honokiol inhibits HIF pathway and hypoxia-induced expression of histone lysine demethylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 422, n. 3, p. 369-374, 2012.

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

YAMADA, D., & TOMIMARU, Y. Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection. *Annals of surgical oncology*, v. 19, n. 3, p. 355-364, 2012.

8. ANEXOS

Anexo 1



UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 13 de Setembro de 2011.

Ao Prezado (a)

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho

Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva

APROVAÇÃO

Referente: ***“Análise da expressão gênica em indivíduos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e células em cultura: relação com o tabagismo”.***

Registro CEP: 818

Vimos por meio desta, declarar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis **avaliou e aprovou** em reunião plenária ocorrida em 13/09/2011 o estudo supracitado, tendo como autores Dr. Marcos Brasilino de Carvalho e Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva e como relator o Dra. Viviane AP. Moreira Lessa.

OBS: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis segue a Resolução 196/96 CNS/MS e as demais normas e legislações pertinentes a Pesquisa Clínica em nosso país, bem como a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP).

NOTA: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis solicita a apresentação obrigatória dos relatórios Semestrais (1303/2012); Anuais (13/092012) e Finais, bem como notificação de eventos adversos, eventuais Emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

Dr. Odilon Victor Porto Denardin.

Coordenador do CEP Heliópolis

HOSPITAL HELIÓPOLIS
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenador CEP
Dr. Odilon Victor Porto Denardin