



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Expressão de HIF-1 α em linfócitos na margem cirúrgica de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em humanos

Suzanny Oliveira Mendes

ALEGRE-ES

Novembro/2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Expressão de HIF-1 α em linfócitos na margem cirúrgica de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em humanos

Suzanny Oliveira Mendes

“Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas”

Orientador: MSc Leonardo Oliveira Trivilin

ALEGRE-ES

Novembro/2011

Suzanny Oliveira Mendes

Expressão de HIF-1 α em linfócitos na margem cirúrgica de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em humanos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da disciplina Seminários de Graduação em Ciências Biológicas

Aprovada: 25 de novembro de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. MSc Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. PhD. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. MV, Especialista em Patologia Animal Maria Aparecida da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

*“Dedico aos que me proporcionaram a origem
da vida”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado tanto durante todo o trabalho.

Ao Prof. MSc Leonardo Oliveira Trivilin, meu orientador, pela imensa prestatividade e dedicação integral a esse trabalho.

À Prof^a. Dr^a Adriana Madeira Álvares da Silva, minha co-orientadora por todo o apoio durante os últimos anos.

A meu pai Adilson Pereira Mendes, mãe Wagna Gomes de Oliveira Mendes e irmã Samylla Oliveira Mendes, por todo o carinho e apoio, não só durante a faculdade, mas por toda a vida.

Ao MSc Marcelo dos Santos, por ter, gentilmente me cedido o material de estudo.

À Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, pela oportunidade de ter realizado este trabalho.

À Prof^a. Juliana Di Giorgio Giannotti e ao Prof. Heberth de Paula pela imensa boa vontade e ótima ajuda na estatística.

À Prof^a. PhD. Louisiane de Carvalho Nunes, por toda a colaboração com o conhecimento na área de patologia, fundamental para o meu estudo.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário do CCA - UFES pelo carinho e pelo conhecimento na área de patologia que me foi cedido.

A todos os professores do CCA-UFES por terem me proporcionado uma ótima formação.

Ao Deivison Mozer, por ter me dado toda a força, apoio, consolo, conforto e ajuda que pude ter, essencial para a concretização deste trabalho.

À Poliana Bergamin, amiga do coração, por estar sempre comigo na melhor fase da minha vida.

À turma de Ciências Biológicas de 2007/2 pelos ótimos anos de convívio.

A todos os amigos que contribuíram direta e indiretamente para o sucesso deste trabalho.

*“Conseguimos realizar os nossos propósitos,
economizando os minutos.”*

Charles Darwin

RESUMO

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento e é frequentemente encontrada em indivíduos que possuem hábitos tabagistas e etilistas e com mais de 50 anos. HIF-1 α é uma proteína com importantes funções no interior e na margem do tumor, normalmente expressa em microambientes hipóxicos, mas também pode ser ativada por meio de inúmeras vias no interior de células inflamatórias. Objetivou-se com este estudo analisar a expressão da HIF-1 α em linfócitos presentes na margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, relacionando os achados de expressão com características prognósticas. Utilizou-se 44 amostras de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que foram submetidas à técnica de imunoistoquímica para a HIF-1 α . As lâminas foram analisadas de acordo com a intensidade de expressão no citoplasma e núcleo de linfócitos peritumorais e os dados relacionados à características prognósticas. Observou-se que houve expressão significativa de HIF-1 α nas amostras estudadas, estando a HIF-1 α mais presente no citoplasma que no núcleo de linfócitos peritumorais, e as intensidades de expressão se correlacionam negativamente com a idade, recidiva local e status de sobrevida do paciente. A HIF-1 α foi mais expressa em pacientes com idade entre 46 a 65 anos e sua expressão forte em linfócitos indica um menor *status* de sobrevida dos pacientes e elevada chance de desenvolver recidiva.

Palavras-chave: Neoplasia, hipóxia, inflamação, carcinoma epidermóide, HIF-1 α

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma of head and neck is a malignant neoplasm that originates from the epithelial lining is often found in individuals who have consumed alcohol and smoking with over than 50 years old. HIF-1 α is a protein with important functions within and outside tumor, normally it is expressed in hypoxic microenvironments, but also can be activated through several pathways inside inflammatory cells. With this study aimed to analyze the expression of HIF-1 α in lymphocytes present in surgical margin of patients with head and neck neoplasia, relating the findings of expression with prognostic features. Was used 44 samples of patients surgical margin with head and neck squamous cell carcinoma that were subjected to the immunohistochemistry technique for HIF-1 α . The slides were analyzed according to the expression intensity in the cytoplasm and nucleus of peritumoral lymphocytes and data relating to prognostic features. Observed there was significant expression of HIF-1 α in the samples studied, being HIF-1 α more present in peritumoral lymphocytes cytoplasm than in nucleus, and the expression intensities was correlated negatively with age, local recurrence and survival status of the patient. HIF-1 α was more expressed in patients with age between 46 and 65 years old and its strong expression in lymphocytes indicates patients low survival status and high chance to develop recurrence.

Key-words: neoplasia, hypoxia, inflammation, squamous cell carcinoma, HIF-1 α

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Os domínios estruturais de HIF-1 α são mostrados. Os domínios básico hélice-alça-hélice(bHLH) e homologia Per-ARNT-SIM (PAS) mediam a dimerização com HIF-1 β (ARNT) e ligação ao DNA; o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) engloba os sítios de prolil hidroxilação (POH) que são requeridos para a ligação da pVHL; e o domínio de transativação (TAD) engloba o sítio de hidroxilação asparaginil (NOH) que bloqueia a ligação dos coativadores p300 e CBP. As prolil (PHD) e asparaginil (FIH) hidroxilases utilizam O₂ e α -cetoglutarase (α -KG) como substratos. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. FONTE: Sitkovsky e Lukashev (2005).....21
- Figura 2: Regulação (in)dependente de O₂ de HIF-1 α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1 α . Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1 α , a atividade da HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1 α / HIF-1 β ativo são mostrados em azul. FONTE: Dehne e Brune (2009).....25
- Figura 3: Gráfico de Média e Desvio Padrão da idade dos pacientes analisados, o valor da média foi correspondente a 54,8 com um desvio padrão de 11,7.32
- Figura 4: Fotomicrografia em lente objetiva de 40x de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Tipos de intensidade de marcação de Linfócitos para a proteína HIF -1 α , onde os linfócitos imunorreativos são marcados por setas e as células neoplásicas são marcadas por asteriscos. A) A figura apresenta alguns linfócitos sem marcação B) Linfócitos fracamente marcados C) Linfócitos moderadamente marcados D) Linfócitos fortemente marcados.36
- Figura 5: Distribuição do percentual de linfócitos imunomarcados referentes à intensidade de expressão da proteína HIF-1 α na margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.37
- Figura 6: Gráfico representativo do número de linfócitos imunorreativos dentro de cada intensidade de expressão da proteína HIF-1 α em margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, conforme faixa etária.38
- Figura 7: Gráfico Box-Plot mostrando a distribuição de localização da proteína HIF-1 α em relação ao núcleo e citoplasma, com suas respectivas médias e desvio padrão.39
- Figura 8 Fotomicrografia em lente objetiva de 40x de linfócitos na margem cirúrgica peritumoral evidenciando a marcação HIF-1 α nos núcleos das células T indicados pelas setas.40
- Figura 9: Fotomicrografia em lente objetiva de linfócitos em margem cirúrgica peritumoral que ilustra a localização da proteína HIF-1 α no citoplasma dos linfócitos.41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas de pacientes, com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com a frequência e porcentagem para cada característica:	31
Tabela 2: Frequência da ocorrência de sítios e subsítios acometidos com o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em pacientes utilizados neste estudo.....	34
Tabela 3: Relação das características prognósticas sobrevida e recidiva local, de acordo com as intensidades de marcação.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Serina/Treonina quinase

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno

ARNT – *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (Translocador receptor de aril hidrocarboneto nuclear)

ATP – Adenosina Trifosfato

bHLH – *basic helix-loop-helix* (Hélice-Alça-Hélice)

BSA – Solução albumina de soro bovino

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

C-TAD – Domínio C-terminal

FIH – Fator de inibição da HIF

FKBP – *FK 506 Binding Protein* (Proteína de ligação FK 506)

FRAP – FKBP-rapamicina

H₂O₂ – água oxigenada

HER2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (Receptor Epidérmico Humano do Fator de Crescimento 2)

HIF -1 – *Hypoxia-inducible factor 1* (Fator induzível por hipóxia -1)

HIF-1 α – *Hypoxia-inducible factor 1 alpha* (Fator induzível por hipóxia -1 alpha)

HIF-1 β – *Hypoxia-inducible factor 1 beta* (Fator induzível por hipóxia -1 beta)

HPV – *Human Papilloma Virus* (Papiloma Vírus Humano)

HREs – *Hypoxia response element* (Elementos Responsivos à hipóxia)

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

mRNA – Ribonucleic Acid (ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro)

N-TAD – Domínio N-terminal

NADPH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (Nicotinamida adenina fosfato)

NF- κ B – *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NO – nitrogênio reativo

NOH – Hidroxilação asparaginil

N-TAD – Domínio N terminal

O₂ – oxigênio

ODD – *Oxygen-dependent degradation* (Domínio de degradação regulado por oxigênio)

ODDD – Domínio de degradação dependente de oxigênio

PAS – Proteína de Período Circadiano

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PCR – *Polymerization Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PHD – Prolil Hidroxilase

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

POH – Prolil Hidroxilação

pVHL – proteína Von Hippel-Lindau

ROS – espécie de oxigênio reativo

SSAT2 – *Spermidine/spermine-N-acetyl-transferase 2*

SIM – Proteína de espírito único

TAD – Domínio de transativação

T_H1 – T *helper* 1

T_H2 – T *helper* 2

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia.....	14
1.2 Histopatologia	15
1.3 Resposta imunológica frente a neoplasias.....	16
1.4 Hipóxia e sua importância no processo inflamatório	18
1.4.1 HIF-1.....	19
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Coleta de amostras e dados epidemiológicos	28
3.2 Imunoistoquímica.....	28
3.3 Análise de expressão.....	29
3.4 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Dados epidemiológicos.....	31
4.2 Análise de expressão da HIF-1 α	35
5 CONCLUSÕES	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7 REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

No mundo, aproximadamente 200 mil novos casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados por ano (WALKER, BOEY, e MCDONALD, 2003). O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço representa 10% dos tumores malignos a nível mundial e abrange aproximadamente 540.000 de portadores gerando em torno de 271.000 mortes anualmente com uma taxa de mortalidade de 50% (PEREZ ORDEÑES et al., 2008), e constituindo a sexta causa de morte por câncer (ALVARENGA et al., 2008).

O carcinoma epidermóide também pode ser denominado carcinoma de células escamosas, carcinoma escamocelular e carcinoma espinocelular e é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento (BRENER et al., 2007). Esta neoplasia é frequentemente localizado na língua, principalmente em indivíduos com idade acima de 50 anos (GILLISON et al., 2007), entretanto, a ocorrência vem aumentando em indivíduos mais jovens em virtude do uso de álcool e tabaco (ALVARENGA et al., 2008).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2001, os tumores malignos de cabeça e pescoço acometem mais frequentemente indivíduos do sexo masculino e relaciona-se com tabagismo e etilismo. No Brasil, estima-se aproximadamente 13.470 novos casos de câncer de cavidade oral por 100 mil habitantes, com taxas de 10.060 para o sexo masculino e 3.410 para o sexo feminino (INCA, 2008). Embora essa neoplasia atinja preferencialmente os pacientes do sexo masculino, nos últimos anos houve um aumento notável na incidência entre mulheres, o que deve refletir a mudança nos hábitos tabagistas e etilistas destas (BRADLEY e RAGHAVAN, 2004).

Estudos revelam que a maioria dos casos de câncer de cabeça e pescoço ocorre em indivíduos brancos, seguidos por mulatos, e em menor porcentagem, os negros (BLOT et al., 2001; CARVALHO et al., 2001; FRANCO et al., 2001; MILLER e RAYENS, 2001). Entretanto, este predomínio, em muitos casos, não pode ser considerado categórico em virtude da ampla miscigenação da população brasileira e da caracterização da etnia de cada indivíduo (CARVALHO et al., 2001).

Sabe-se que existe uma relação positiva entre o consumo de tabaco e álcool e o aparecimento de tumores na cavidade oral. Tabagistas apresentam um risco cinco vezes maior de desenvolver câncer oral do que não tabagistas, sendo que este risco é potencializado quando o uso do tabaco é concomitante com o do álcool (FORASTIERE et al., 2001; GILLISON, 2007). Além destes fatores carcinogênicos, a ocorrência do tumor também está relacionada com a existência de fatores individuais de suscetibilidade (COJOCARIU et al., 2009; GILLISON et al., 2007). Os demais fatores ambientais determinantes da doença estão associados com a condição socioeconômica do paciente, esta associação pode ser explicada pela pobreza, alimentação deficiente e dificuldade de acesso ao serviço de saúde (FREEMAN, 2004; WARD, 2004).

Dados demonstram que, mesmo com um tumor já diagnosticado, a persistência do tabagismo e do etilismo diminui o índice de cura do paciente e aumenta a ocorrência de um segundo tumor. Pacientes que permanecem fumando durante a radioterapia parecem apresentar menores índices de resposta ao tratamento assim como sobrevida menor do que aqueles que pararam completamente de fumar (INCA, 2001).

Em virtude de problemas clínicos relacionados ao hábito de tabagismo ou etilismo, muitos pacientes morrem de doenças intercorrentes (INCA, 2001), visto que tais hábitos aumentam o risco do indivíduo desenvolver outras doenças crônicas do que indivíduos não fumantes (INCA, 2010). Além disso, o tabagismo também é um fator de risco para câncer de pulmão, laringe, pâncreas, fígado, bexiga, rim, leucemia mielóide e, associado ao consumo de álcool, de câncer de cavidade oral e esôfago (INCA, 2010).

1.2 Histopatologia

Para o estudo dos diversos tipos de câncer, são necessários estudos histopatológicos, os quais podem prover fatores prognósticos suplementares a fim de auxiliar na escolha terapêutica (LOURENÇO et al., 2007).

Define-se como margem macroscópica a porção de tecido aparentemente normal que o cirurgião pretende retirar, entretanto essa margem só é facilmente

reconhecida em tumores cujas células formam grupamentos bem definidos, já em tumores infiltrativos as células se espalham e o reconhecimento das bordas se torna mais difícil. Do ponto de vista oncológico, quanto maior for a margem de segurança retirada, menor será a probabilidade de ocorrência da recidiva do tumor (KOPKE et al., 2005).

O sistema de Gradação de Margens Invasivas segundo Bryne et al. (1989), primariamente avaliava apenas as áreas mais anaplásicas dos sítios de maior invasividade dos tumores. Os autores afirmavam que as células das áreas profundamente invasivas de um tumor mostravam alterações mais parecidas com aquelas observadas em metástases, além de possuírem maior probabilidade de causar a disseminação do tumor, sendo, portanto, consideradas como as células que iriam ditar o comportamento clínico da lesão maligna.

Brandwein-Gensler et al. (2005) afirmaram que a condição das margens tumorais é uma característica considerada de grande influência no prognóstico, mas não possui valor preditivo para o risco do carcinoma de células escamosas em geral. Este estudo também avaliou o impacto do limite de ressecção de margens, sendo estas positivas ou negativas para células malignas, de pacientes com câncer de células escamosas de cavidade oral. Adicionalmente avaliaram a incidência e correlação com outras variáveis histopatológicas e clínicas, como a sobrevida do paciente e a recidiva do tumor.

A análise da margem cirúrgica é sempre requerida, para avaliar se a cirurgia envolveu todo o tumor, ou também para verificar a malignidade do tumor e seu poder de infiltração e por fim, obter-se um julgamento final em relação às margens de segurança. A interpretação errônea da situação do tumor em relação às bordas da peça cirúrgica pode levar ao surgimento de conceitos deturpados acerca da capacidade que os tumores têm de causar danos (KOPKE et al., 2005).

1.3 Resposta imunológica frente a neoplasias

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2001), o sistema imune ineficiente do indivíduo pode permitir o crescimento e desenvolvimento de tumores.

A função fisiológica de evitar o crescimento de células neoplásicas e/ou destruí-las é denominada vigilância imunológica. De modo que tumores malignos expressam diferentes tipos de antígenos tumorais, como proteínas modificadas, produtos de oncogenes ou de genes supressores de tumor, ou, em grande parte, proteínas que são expressas em excesso ou de forma aberrante. (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007)

O reconhecimento do corpo estranho induz um complexo programa de células imunológicas, as quais são designadas para matar e remover os invasores (DEHNE e BRUNE, 2009). Neste contexto, as respostas tumorais em geral são induzidas pelo reconhecimento desses antígenos tumorais. As células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais do hospedeiro fagocita as células neoplásicas e os antígenos são processados e exibidos na superfície das APCs via MHC de classe I e II, para que sejam reconhecidos pelas células T CD8⁺ e também pelas T CD4⁺ (FALLON et al., 2002; KOBAYASHI et al., 1998; TERABE, PARK e BERZOFSKY, 2003).

Por outro lado, este mecanismo pode não ser eficiente em algumas situações de ineficácia de resposta imunológica ou porque alguns tumores esquivam-se do ataque imunológico. Em geral, alguns tumores têm um crescimento demasiadamente acelerado e o combate ao tumor se torna ineficiente, outros apresentam antígenos tumorais pouco imunogênicos, em virtude da semelhança dos auto-antígenos, e também alguns tumores não expressam antígenos alvo do ataque imunológico ou até deixam de expressar o MHC (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

Enquanto os linfócitos T CD8⁺ têm a função citolítica, os T CD4⁺ são conhecidos como linfócitos T auxiliares e compreendem 2 subpopulações de células com funções diferentes, as T_H1 e T_H2. A subpopulação T_H1 secreta IFN- γ que ativa os macrófagos que tenham fagocitado um corpo estranho (patógeno ou uma célula neoplásica) resultando no aumento da atividade destes, e conseqüentemente, morte do material fagocitado (BENJAMINI, COICO e SUNSHINE, 2002). Já a subpopulação T_H2 funciona limitando a lesão decorrente da ativação de macrófagos. Quando as células T_H2 diferenciadas reconhecem os antígenos tumorais, elas produzem várias citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, que inibem a ativação dos macrófagos. Devido a esta ação, as células T_H2 podem limitar a lesão tecidual

que frequentemente ocorre na resposta imune mediada por células T_H1 . A resolução da inflamação pode ser determinada pelo equilíbrio entre a ativação das células T_H1 e T_H2 em resposta ao tumor (FOWELL et al., 1991; SAKAGUCHI e SAKAGUCHI, 1994; SHIMIZU, YAMAZAKI e SAKAGUCHI, 1999).

1.4 Hipóxia e sua importância no processo inflamatório

Células de mamíferos desenvolveram uma maquinaria molecular para determinar se as células irão tentar sobreviver ou entrar em apoptose sob condições de hipóxia (BRUICK e MCKNIGHT, 2001; EPSTEIN et al., 2001). Então, para manter a homeostase do oxigênio, muitos organismos eucariotos adaptaram um mecanismo especializado para reforçar a distribuição do mesmo. Desta forma, uma via responsiva dependente de oxigênio foi conservada e está presente em quase todas as células de mamíferos (BRUICK, 2003; STIEHL, 2006). A formação do Complexo HIF-1 (Fator induzível por hipóxia) agirá como fator de transcrição para diversos genes essenciais para a sobrevivência de células em hipóxia (BRUICK e MCKNIGHT, 2001; EPSTEIN et al., 2001; HUANG e BUNN, 2003; IVAN et al. 2001; IYER et al., 1998; JAAKKOLA et al., 2001; MASSON et al., 2001; SEMENZA, 1999).

Hipóxia forma um componente chave de várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, doenças inflamatórias e a progressão de tumores sólidos (RANTANEN, 2008). Uma baixa tensão de oxigênio tem sido mostrada em vários tecidos normais, inflamados e cancerosos. (DEWHIRST, 1998). No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a hipóxia e a densidade vascular são responsáveis pela resistência à quimioterapia e radioterapia, proporcionando um pior prognóstico (SCHÖDER et al., 2009), visto que as células respondem à essas condições e permite a progressão de tumores sólidos (MAXWELL et al., 1997; RYAN, 2000), como por exemplo os tumores de mama, pulmão, ovário e oral (BUNN, 1996; GIORDANO e JOHNSON, 2001; SEMENZA, 2002; TALKS et al., 2000; ZHONG et al., 1999).

Respostas inflamatórias a corpos estranhos normalmente ocorrem em microambientes hipóxicos, uma vez que em locais de inflamação o consumo de O_2 é muito elevado, enquanto o suprimento sanguíneo é interrompido em virtude dos vasos obstruídos por fagócitos ou são vasoconstritos por citocinas (SITKOVSKY e

LUKASHEV, 2005). Tais respostas incluem a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) e/ou nitrogênio (NO), produção de citocinas, bem como apresentação de antígeno para ativar a resposta imune adaptativa (DEHNE e BRUNE, 2009). Todo este metabolismo das células imunológicas para combater o patógeno, ocorre identicamente em tumores, incluindo a produção de citocinas.

Citocinas são um grupo de mensageiros liberados durante a inflamação contra o tumor, elas ajudam a orquestrar as atividades dos fagócitos, contribuindo para uma otimização da resposta inflamatória. TNF α juntamente com IL-1 β são rapidamente liberados pelos macrófagos após o reconhecimento, e são altamente importantes para a ativação imune celular, e assim, a defesa contra o tumor pode ser bem sucedida (DEHNE e BRUNE, 2009). Muitas células imunológicas fazem parte desse arranjo no combate ao tumor, incluindo macrófagos e células TCD4 $^{+}$, entretanto a resposta contra o tumor é preferencialmente do linfócito TCD8 $^{+}$, independente do auxílio do TCD4 $^{+}$ (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

O sucesso da eliminação das células neoplásicas demanda da sobrevivência das células imunológicas em todos os microambientes do tecido e requer uma adaptação de células imunológicas em reduzida disponibilidade de oxigênio. A detecção da hipóxia e a resposta pelas células do sistema imunológico à mesma, são facilitadas pela HIF-1 α a exemplo do que ocorre com quase todos os tipos celulares dos mamíferos (DEHNE e BRUNE, 2009; HUANG e BUNN, 2003; SEMENZA, 2003).

1.4.1 HIF-1

O complexo HIF-1 (Fator induzível por hipóxia - 1) é o principal mecanismo de regulação para a homeostase do oxigênio celular e sistêmico (BRUICK e MCKNIGHT, 2001; EPSTEIN et al., 2001; HUANG e BUNN, 2003; IVAN et al. 2001; IYER et al., 1998; JAAKKOLA et al., 2001; MASSON et al., 2001; SEMENZA, 1999). Quando ligado ao DNA genômico, o complexo age como fator de transcrição de mais de 60 genes que desencadeiam mecanismos específicos para evitar a morte celular causada pela hipóxia. Por fim, as proteínas desses genes aumentam as concentrações de oxigênio por meio da angiogênese (HARRIS, 2000), além de

enzimas do transporte de glicose e metabolismo (SEMENZA 2002; SEMENZA 2003).

A proteína HIF-1 é um heterodímero composto por duas subunidades, uma constitutivamente expressa, a HIF-1 β , a qual possui mRNA e proteína mantidos em níveis constantes na célula, e outra regulada por O₂, a HIF-1 α , ambas são membros da família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH), PAS (proteína de período circadiano), ARNT (translocador receptor de aril hidrocarboneto nuclear) e SIM (proteína de espírito único). (KAELIN e RATCLIFFE, 2008; OZER e BRUICK, 2007; SEMENZA, 2008; WEIDEMANN e JOHNSON, 2008).

A subunidade HIF-1 α possui os domínios bHLH e PAS, sendo que o domínio PAS da HIF-1 α interage com o domínio PAS da HIF-1 β para promover a heterodimerização entre essas duas subunidades (CHOWDHURY, HARDY e SCHOFIELD, 2008). Existem também mais dois domínios presentes na HIF-1 α , o N-terminal (N-TAD) e o C-terminal (C-TAD), localizados nas porções C-terminal e mediana da proteína (RUAS, POELLINGER e PEREIRA 2002), os quais atuam na ativação da transcrição gênica, como por exemplo, interagindo com o co-ativador transcricional CBP/p30056 (LANDO et al., 2002). Outro domínio importante da HIF-1 α é o ODD (degradação regulada por oxigênio), que media sua estabilidade de acordo com a disponibilidade de oxigênio (PUGH et al., 1997). Dentro deste domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) existem dois sítios para a proliferação hidroxilação dependente de oxigênio, no ODDD N-terminal ou no ODDD C-terminal (IVAN et al., 2001; JAKKOLA et al., 2001) como ilustrado na Figura 1.

A transcrição e síntese protéica da HIF-1 α são constitutivas e particularmente não são afetadas pelo teor de oxigênio (KALLIO, 1997; LI, KO e WHITLOCK, 1996; WANG e SEMENZA, 1993; WANG et al., 1995; WIESENER et al., 1998). A dependência do oxigênio da HIF-1 α baseia-se nas modificações pós-traducionais (CHOWDHURY, HARDY e SCHOFIELD, 2008), como hidroxilação, acetilação e ubiquitinação do domínio ODD para ela ser degradada no proteossomo da célula (BRAHIMI-HORN, MAZURE, POUYSSEGUR, 2005; LANDO, et.al., 2002).

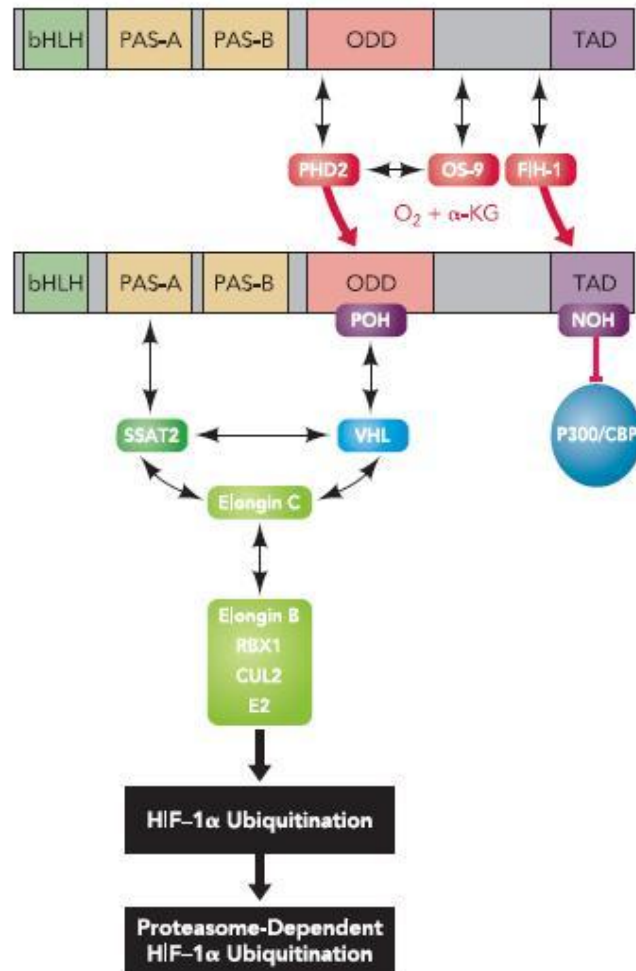


Figura 1: Os domínios estruturais de HIF-1 α são mostrados. Os domínios básico hélice-alça-hélice (bHLH) e homologia Per-ARNT-SIM (PAS) mediam a dimerização com HIF-1 β (ARNT) e ligação ao DNA; o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) engloba os sítios de prolil hidroxilação (POH) que são requeridos para a ligação da pVHL; e o domínio de transativação (TAD) engloba o sítio de hidroxilação asparaginil (NOH) que bloqueia a ligação dos coativadores p300 e CBP. As prolil (PHD) e asparaginil (FIH) hidroxilases utilizam O₂ e α -cetoglutarase (α -KG) como substratos. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. FONTE: Sitkovsky e Lukashev (2005).

Em geral, a abundância de subunidade α é primariamente regulada pela família de prolil hidroxilases chamadas PHD1, PHD2 e PHD3 (Prolil hidroxilase) (KAELIN e RATCLIFFE, 2008; WEIDEMANN e JOHNSON, 2008), porém existe uma gama de outras proteínas com funções reguladoras da HIF-1 α , principalmente em microambientes inflamados (DEHNE e BRUNE, 2009; SITKOVSKY e LUKASHEV, 2008; THIEL et al., 2007; SCHARTE, 2003).

Sob condições de normóxia, a HIF-1 α é submetida à hidroxilação no resíduo de prolina 402 e/ou 564 do domínio ODD pela PHD a qual utiliza o oxigênio como cofator enzimático (BRUICK, 2000; CHOWDHURRY e SCHOFIELD, 2008; JAAKKOLA et al., 2001; KAELIN e RATCLIFFE, 2008; MASSON et al., 2001; SRINIVAS et al., 1999), a proteína OS-9 se liga à PHD e HIF-1 α facilitando a hidroxilação (BAEK et al., 2005). Após a hidroxilação, a HIF-1 α é reconhecida pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau), a qual interage com a porção C-terminal e assim recruta um complexo ubiquitina ligase para marcar a proteína HIF-1 α para degradação proteossomal (BAEK et al., 2007; COCKMAN et al., 2000; IVAN et al., 2001; KALLIO et al., 1999; MAXWELL et al., 1999; SALCEDA e CARO, 1999; TANIMOTO et al., 2000; WENGER, 2002).

A proteína SSAT2 interage com HIF-1 α , pVHL e porção C-terminal e estabiliza a interação da pVHL com a porção C-terminal, e assim, facilita a ubiquitinação da HIF-1 α (BAEK et al., 2007). O FIH (fator de inibição da HIF) hidroxila o resíduo aspargil C-terminal em subunidades HIF-1 α e impede a interação com co-ativadores, os quais são essenciais para a atividade transcricional de HIF (KAELIN e RATCLIFFE, 2008; MAHON, HIROTA e SEMENZA, 2001; WEIDEMANN e JOHNSON 2008).

Sob condições de hipóxia, a atividade da PHD decresce e a degradação da HIF-1 α é bloqueada, uma vez estabilizada, ela é translocada para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcionalmente ativo, o qual irá reconhecer elementos responsáveis a hipóxia (HREs) que por sua vez, induzem a transcrição de vários genes alvo envolvidos no metabolismo celular, angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose, glicólise entre outros (HUANG et al., 1996; KALLIO et al., 1997; SCHARTE, 2003; SEMENZA, 1999).

Em contraste à degradação com regulação dependente de oxigênio da HIF-1 α , a estimulação de fatores de crescimento induz a síntese de HIF-1 α via transdução de sinal conduzida pelo receptor tirosino quinase tal como HER2(neu) para fosfatidilinositol-3-quinase(PI3K) para as serina/treonina quinases AKT (proteína quinase B) e FRAP (FKBP-rapamicina) (LAUGHNER, et al., 2001). Esta via é regulada negativamente pela proteína supressora de tumor PTEN, a qual desfosforila os produtos da reação de PI3K, aumentando os níveis de PTEN que

inibem a expressão de HIF-1 α e os genes de transcrição mediada pela HIF-1 em câncer de próstata e células glioma (ZHONG, et al., 2000).

Além do seu papel na homeostase do oxigênio há sugestões de evidências de um importante papel para a HIF-1 α em reações imune. Várias citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios têm sido mostrados para promover uma “*upregulation*” da expressão da proteína HIF-1 α , bem como a ligação da HIF-1 ao DNA sob condições de hipóxia ou normóxia (BLOUIN et al., 2004; HELLWIG-BURGEL et al., 1999; SCHARTE et al., 2003).

Em um tecido inflamado as concentrações de oxigênio são frequentemente abaixo das pressões parciais fisiológicas (SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005). Conseqüentemente há o acúmulo crescente de quantidades de HIF-1 α . Nos locais de inflamação o número de células inflamatórias aumenta e sua ativação produz uma variedade de citocinas, ROS e NO. (DEHNE E BRUNNE, 2009). Entretanto, a HIF-1 α pode sofrer “*upregulation*”, ou seja, os níveis de expressão desta proteína podem ser aumentados até mesmo sob condições de normóxia pela IL-4 (SCHARTE, 2006), TNF- α (HADDAD e LAND, 2001), IL-1 (FREDE, 2005) e outras citocinas (LUKASHEV e SITKOVSKY, 2008).

A HIF-1 α foi mostrada por ser criticamente envolvida em funções de regulação antibacteriana de macrófagos (CRAMER, T. et al, 2003) e células T (THIEL et al, 2007). Também é demonstrado que deficiência específica de HIF-1 α por células T resultam no aumento da resposta antibacteriana em tecidos hipóxicos inflamados e é associado com o aumento da expressão de NF- κ B p50 mRNA em células T ativadas (THIEL et al, 2007).

Na inflamação inicial os macrófagos e neutrófilos produzem uma explosão de ROS após a montagem de oxidase NADPH. A explosão respiratória não é crítica apenas para a ação antitumoral dos fagócitos, mas também se torna deletéria para o hospedeiro se a formação de ROS continua descontrolada. Há um risco de antioxidantes, como o ascorbato, se tornarem limitantes na proteção contra o estresse oxidativo. O ascorbato é essencial para manter o ferro nas PHDs reduzidas e então, para prevenir a inativação da enzima. Na verdade, a deficiência de ascorbato limita a função da PHD nos tumores humanos e conseqüentemente o aumento da proteína HIF-1 α (KAELIN e RATCLIFFE, 2008). O regulador

transcricional JunD aumenta níveis de antioxidantes e sua deleção estabiliza a HIF-1 α por causa do aumento da formação de ROS (GERALD et al., 2004).

A administração de H₂O₂ ou um agente redox (que geram superóxidos dentro das células), também induzem o acúmulo da proteína HIF-1 α e aumenta a atividade do complexo HIF-1 (BRUNE e ZHOU, 2007; KAELIN e RATCLIFFE, 2008). É mostrado que ROS oxida o Fe(II) no sítio catalítico das PHDs, e então bloqueia sua atividade (GERALD et al., 2004). Outra possibilidade é que ROS inibe as hidroxilases de HIF pela oxidação irreversível do sítio ativo de aminoácidos, com resíduos de histidina sendo propenso a inativação da enzima por oxidação induzida. Essas considerações implicam que um aumento de ROS durante a inflamação pode contribuir para um acúmulo de HIF-1 α e sua ativação (DEHNE e BRUNE, 2009).

Adicionalmente, o NO atenua a ubiquitinação da HIF-1 α e reduz a atividade da PHD, implicando que hipóxia e NO usam sobreposições de sinalização de vias para estabilizar a HIF-1 α . Estudos espectroscópicos usando enzimas que coordenam o Fe(II) em seus sítios catalíticos comparáveis com PHDs tem mostrado que NO coordena o íon ferroso diretamente (BRUNE e ZHOU, 2007). Apesar de não ser formalmente comprovado para PHDs, é racional arguir que NO coordena o ferro catalítico de PHDs, bloqueando assim, a atividade desta enzima. No entanto, o aumento da expressão da PI3K, a qual aumenta os níveis de HIF-1 α em resposta ao NO também foi proposto (BRUNE e ZHOU, 2007). Além disso, a estabilização da HIF-1 α através da S-nitrosilação com NO gerada a partir de macrófagos vizinhos é mostrada no tecido tumoral (SONVEAUX, et al., 2007).

Espécies ROS e NO, ativam vias a partir de TNF- α e IL-1 β , que induzirão a produção de PI3K e/ou NF- κ B que por sua vez, irão ativar o complexo HIF-1 (BURGEL, et al., 1999; BRUNE e ZHOU, 2007). Embora detalhes permaneçam desconhecidos, a IL-1 β estimula a tradução de HIF-1 α , pois nem os níveis de mRNA de HIF-1 α nem as proteínas de hidroxilação são afetados (FREDE et al., 2005).

A proteína HIF-1 α é regulada depois da estimulação do receptor de adenosina de uma espécie de PI3K-dependente. A ativação de HIF1 pela PI3K-dependente ainda não foi investigada, mas fatores de crescimento, oncogenes ou supressores de tumor inativos, ativam múltiplos eventos de fosforilação que podem tanto resultar em tradução de HIF-1 α ou transativação de HIF-1 (WEIDEMANN e JOHNSON,

2008). Embora o constante estado da expressão de proteína HIF-1 α é, sobretudo, determinada pela degradação pela via da hidroxilação mediada, o aumento da tradução da proteína pode alterar o balanço por meio da esmagadora degradação do sistema (DEHNE e BRUNE, 2009). (Figura 2)

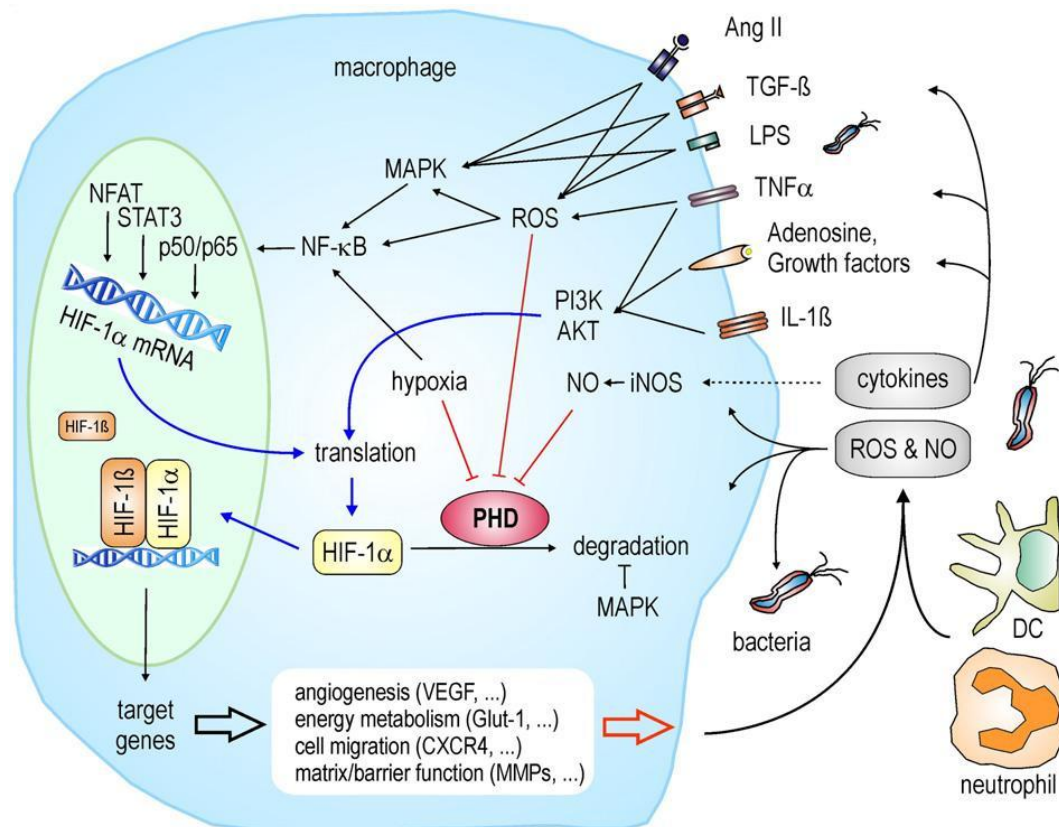


Figura 2: Regulação (in)dependente de O $_2$ de HIF-1 α no microambiente inflamatório. Múltiplos sinais afetam transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais de HIF-1 α . Estes múltiplos sinais, exemplificado por macrófagos, afetam a quantidade de proteína HIF-1 α , a atividade da HIF-1 e concomitantemente genes alvo de expressão. Vias que bloqueiam a atividade da PHD são marcadas em vermelho. Vias de sinalização que conduzem à formação do heterodímero HIF-1 α /HIF-1 β ativo são mostrados em azul. FONTE: Dehne e Brune (2009).

Por outro lado, foi sugerido que o dano à microcirculação e conseqüente diminuição da oferta de oxigênio (locais de tecidos hipóxicos) podem servir como sinais primários de dano tecidual excessivo e necessidade de desativar as células imunológicas (SITKOVSKY et al., 2004). Um dos sinais de hipóxia gerado por inflamação pode ser o acúmulo extracelular de adenosina (THIEL et al., 2005), enquanto o segundo sinal pode ser provido pelo sensoriamento de hipóxia (SITKOVSKY et al., 2004).

Foi proposto que células super ativas em áreas inflamadas e hipóxicas são “*downregulated*” por receptores de adenosina A_{2A} (SITKOVSKY et al., 2004) e por HIF-1 α (CARMELIET et al., 1998; SEMENZA, 1999), as quais podem agir em conjunto (SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005). Assim, confirmando a validade geral desta hipótese “hipóxia anti-inflamatória”, o papel anti-inflamatório da HIF-1 α em células T *in vivo* continuaram a ser comprovadas utilizando modelos genéticos aprimorados. A hipótese da HIF-1 α ser anti-inflamatória em células T parece ser contra-intuitiva, desde que a eliminação de HIF-1 α de células-alvo mielóides resultou em perda da resposta inflamatória destas levando à impressão de que HIF-1 α em células mielóides é pró-inflamatória (CRAMER, et al., 2003).

Entretanto, as células T podem ser diferentes dos macrófagos e neutrófilos os quais são conhecidos por serem muito mais dependentes da glicólise e derivados de ATP e, portanto a glicólise é controladora da HIF-1 α nestas células (CRAMER, et al., 2003). Thiel et al. (2007) consideram que desde que a HIF-1 α não é tão crítica para a sobrevivência das células T ativadas em curto prazo, como é para células mielóides, ela desempenha um importante papel de “*downregulation*” em células T nos microambientes de tecidos inflamados e hipóxicos *in vivo* agindo em conjunto com outros mecanismos de hipóxia (SITKOVSKY et al., 2004; SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005).

As células T auxiliares ativadas secretam citocinas com propriedades tanto inflamatórias como anti-inflamatória pelas subpopulações T_{H1} e T_{H2} respectivamente (SCHARTE et al., 2003). Vários estudos apóiam o papel anti-inflamatório da citocina IL-4 do T_{H2}. IL-4 promove uma “*downregulation*” de T_{H1} associados a lesão (IJIJIMA et al., 1999).

O efeito da IL-4 na HIF1- α é diferente da de outros mediadores pró-inflamatórios em vários aspectos, enquanto as citocinas pró-inflamatórias TFN- α , INF- γ , e IL-1 β aumentam a resposta de HIF1- α durante a normóxia (SCHARTE et al., 2003; HELLWIG-BURGEL et al., 1999; AWAD et al., 2000), IL-4 aumenta os níveis da proteína HIF1- α apenas durante a hipóxia (SCHARTE et al., 2003). A IL-4 induzida por acúmulo de proteína HIF1- α parece ser principalmente resultado da expressão de genes que aumentam a HIF1- α , ao passo que citocinas pró-inflamatórias e hipóxia induzem o acúmulo da proteína HIF1- α sem afetar a

transcrição do gene HIF1- α (HELLWIG-BURGEL et al., 1999; SCHARTE et al., 2003; ZHOU, SCHMID e BRUNE, 2003).

Uma vez que a proteína HIF-1 α , é uma reguladora chave da resposta imune, essa apresenta importantes funções no combate ao tumor de acordo com os subtipos celulares em que a mesma se encontra. Acredita-se que em linfócitos TC8⁺ esta proteína tenha um efeito protetor, de forma a aumentar a atividade destes linfócitos, e aumento da lise de células neoplásicas, o mesmo se segue para linfócitos TCD4⁺ do tipo T_H1, onde a proteína terá o efeito de elevar a resposta contra o tumor. Por outro lado, em células TCD4⁺, a HIF-1 α terá a função de suprimir a resposta imune, em virtude da fisiologia desta célula.

Assim, as células de mamíferos são capacitadas a responderem modificações ambientais, como a modificação de tensão do oxigênio, pela expressão de genes específicos, que atuam mantendo a homeostase tecidual (LEE et al., 2004; PAPANDREOU et al., 2005; SEMENZA, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar a expressão da proteína HIF-1 α em linfócitos na margem cirúrgica de tumores de cabeça e pescoço humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a distribuição da proteína HIF-1 α nos linfócitos presentes em margem cirúrgica quando ao núcleo e citoplasma.
- Avaliar a dependência de algumas características prognósticas com a expressão da HIF-1 α .
- Descrever os aspectos epidemiológicos dos pacientes cuja margem foi analisada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras e dados epidemiológicos

O material utilizado neste trabalho constitui de 44 amostras de tecido de margem cirúrgica provenientes de pacientes operados com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, de diferentes etnias e idade variável entre 34 e 81 anos. Todos os pacientes foram tratados cirurgicamente no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, São Paulo, dentre o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005, e tiveram confirmação histopatológica do diagnóstico. Os pacientes tiveram um seguimento mínimo de 24 meses a partir do tratamento inicial no Hospital Heliópolis.

Os registros clínicos, patológicos e de seguimento dos pacientes foram obtidos a partir das informações depositadas no banco de dados do Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, armazenado online no endereço <http://www.compbio.ludwig.org.br/clinicalgenomics/>.

Foram excluídos os casos de câncer de lábio, e os casos com confirmação para o papiloma vírus (HPV) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Heliópolis em 10 de Junho de 2008. Os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Imunoistoquímica

Os tecidos então selecionados para o estudo sofreram cortes histológicos para seguinte montagem das lâminas. Tais lâminas foram submetidas a reações de imunoistoquímica pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®).

Foram realizados controles positivo e negativo utilizando amostras com a expressão da HIF-1 α previamente conhecida em tumor de mama da seguinte maneira: um controle positivo, e três negativos, sendo o primeiro sem anticorpo primário, o segundo sem anticorpo secundário e o terceiro sem a reação de revelação.

Antes do tratamento com os anticorpos, as lâminas sofreram um processo de hidratação progressiva em álcool e em seguida, inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% durante 10 minutos, e lavadas em PBS. Após a lavagem, as lâminas foram imersas em ácido cítrico (pH 6) e aquecidas a vapor a 90° C por 30 minutos.

O anticorpo primário utilizado, anti-HIF-1 α , tem como epítipo o C-terminal e foi diluído em 1/150 (Millipore Corporation®, código 07-628), solução PBS/1%BSA. As lâminas foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente e lavadas com PBS. Posteriormente as lâminas foram incubadas no anticorpo secundário (*biotinyted link universal*), seguida de lavagem em PBS.

Para a revelação foi utilizada a 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma®), e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. E montadas com a lamínula fixada com resina.

3.3 Análise de expressão

As lâminas foram observadas por meio de microscopia de luz, objetiva de 40x, onde foram selecionados 10 campos aleatórios peritumorais para a contagem de linfócitos imunorreativos. Tais células foram classificadas de forma semiquantitativa quanto à intensidade de marcação em fraca, moderada e fortemente marcadas. Realizou-se o somatório da contagem das células imunorreativas nos campos selecionados em cada amostra de margem de tumor para que os dados pudessem ser comparados.

Também foi realizada uma análise da expressão da HIF-1 α em relação à localização entre núcleo e citoplasma para cada intensidade de marcação, e foram atribuídos escores de acordo com a taxa de incidência da proteína (baixa = +, moderada = ++, alta= +++). Os dados obtidos foram dispostos em tabela e conferidos valores aos escores encontrados, sendo 0 para ausência; 1 para baixa; 2 para moderada e 3 para alta.

3.4 Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas, realizou-se um somatório das células imunomarcadas com cada intensidade de expressão, e estes valores foram agrupados de acordo com cada categoria a ser analisada.

Com os dados computados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para determinar a diferença entre as intensidades de expressão de HIF-1 α nas amostras analisadas, seguido pelo teste de Dunn.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para definir a diferença na distribuição da proteína HIF-1 α na célula, entre o núcleo e o citoplasma.

Um teste de Qui-quadrado (X^2) foi empregado para verificar se houve relação entre a idade dos pacientes e a expressão da proteína, bem como avaliar qual foi a intensidade de marcação mais significativa. Para tal cálculo as idades foram categorizadas da seguinte forma 1 = indivíduos com idade ≤ 45 anos, 2 = indivíduos com idade entre 46 a 65 anos e 3 = indivíduos com idade ≥ 66 anos.

Com o intuito de averiguar se a expressão da HIF-1 α interferiu na recidiva local do tumor, foi realizada uma Análise de Prova de Tendência Linear. Adicionalmente, para verificar se essa interferência era em função da localização da HIF-1 α no núcleo ou no citoplasma, foi utilizado um Teste de Independência do Qui-quadrado. Por fim, uma Análise de Prova de Tendência Linear do Qui-quadrado foi aplicada para avaliar se a expressão de HIF-1 α interferiu no *status* de sobrevida dos pacientes, na recidiva local do tumor e qual a intensidade foi mais significativa nesta relação.

Os cálculos estatísticos foram realizados no BioEstat 5.0 e no GrahPadPrism 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados epidemiológicos

Com base no estudo epidemiológico das amostras, pôde-se verificar que a maioria dos pacientes acometidos pelo tumor foi do gênero masculino com porcentagem de 86,36% para indivíduos do gênero masculino e 13,64% para o gênero feminino, dado que está de acordo com vários estudos como os do INCA (2001) e Bradley e Raghavan (2004), que dizem esta taxa ser maior em gêneros masculinos pelo fato de serem os indivíduos que mais apresentam hábitos tabagistas e etilistas.

Todos os pacientes acometidos pelo carcinoma epidermóide que compõem a amostra deste estudo estão representados em sua frequência e porcentagem de acordo com os aspectos epidemiológicos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Características epidemiológicas de pacientes, com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com a frequência e porcentagem para cada característica:

Características epidemiológicas	Frequência	Porcentagem
Gênero		
Feminino	6	13,64%
Masculino	38	86,36%
Faixa etária		
<45	11	25%
46-65	25	56,81%
>66	8	18,19%
Hábito tabagista		
Sim	41	93,18%
Não	3	6,82%
Hábito Etilista		
Sim	36	81,81%
Não	8	18,19%
Etnia		
Branco	33	75%
Mulato	8	18,18%
Negro	3	6,89%

Um estudo realizado em Belo Horizonte (MG) com 740 pacientes, também apresentou resultados semelhantes, sendo que a porcentagem de indivíduos

acometidos pelo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço era de 82,7% para o gênero masculino e 17,3% para o gênero feminino. No entanto estudos apontam um aumento gradual de ocorrência desta neoplasia em mulheres, em virtude da mudança de seus comportamentos ao longo dos anos, onde essas estão mais expostas à associação tabagismo-etilismo (AMORIM FILHO et al., 2003; BRADLEY e RAGHAVAN, 2004; CARVALHO, IKEDA e MAGRIN, 2004).

Ao observar a idade dos pacientes analisados, notou-se que as mesmas variaram de 34 a 81 anos com média de 54,8 anos (Figura 3). A maioria dos indivíduos tinha idade próxima de 50 anos de idade, assim como observado em vários estudos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, os quais citam que esta neoplasia acomete principalmente indivíduos com idade próxima ou maior que cinco décadas de vida (ALVARENGA et al., 2008; GILLISON et al., 2007; INCA 2001).

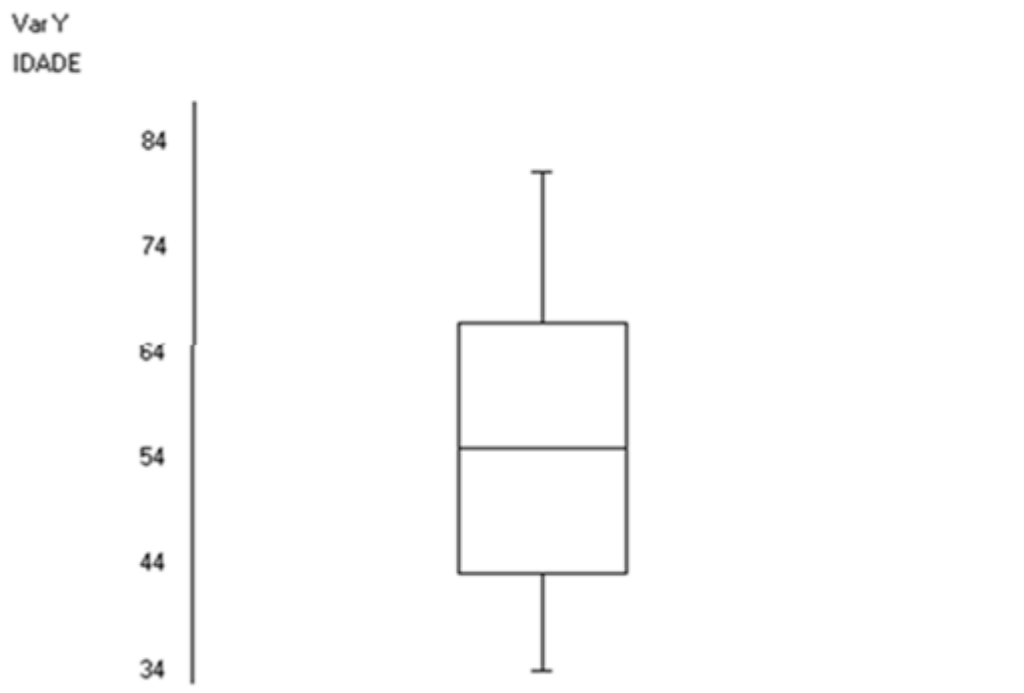


Figura 3: Gráfico de Média e Desvio Padrão da idade dos pacientes analisados, o valor da média foi correspondente a 54,8 com um desvio padrão de 11,7.

A faixa etária mais representativa para incidência do tumor foi entre 46 e 65 anos, corroborando com diversos dados acerca de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (ALVARENGA et al., 2008; GILLISON et al., 2007; INCA 2001), indivíduos estes que já tiveram muito contato com os carcinógenos contidos no álcool e tabaco, o que facilitou a ocorrência das mutações das células (BELLO, SOINI e SALO, 2010).

Além destes fatores carcinogênicos, a ocorrência deste tumor também pode estar relacionada com a existência de fatores individuais de suscetibilidade (COJOCARIU et al., 2009; GILLISON et al., 2007), e também aos demais fatores ambientais determinantes da doença como a condição socioeconômica do paciente, que inclui a pobreza, alimentação deficiente e dificuldade de acesso ao serviço de saúde (FREEMAN, 2004; WARD, 2004).

Apesar dos incontáveis estudos relacionando álcool e tabaco com o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, alguns estudos revelam que a ocorrência desses tumores vem aumentando progressivamente em indivíduos do sexo feminino, e indivíduos mais jovens, ou seja, com menos de 50 anos de vida. O que complementa os estudos anteriores, mostrando que os hábitos tabagistas e etilistas estão sendo mais disseminados na população (ALVARENGA et al., 2008; BRADLEY e RAGHAVAN, 2004).

Em relação à etnia, a maioria dos indivíduos estudados considerava-se branca, 75%, seguidos por mulatos com 18,8%, e por fim, negros representando 6,89% dos pacientes estudados. Dado também observado por (CARVALHO et al., 2001; FRANCO et al., 2001; MILLER e RAYENS, 2001 e BLOT et al., 2001). As etnias podem ser estudadas de maneiras distintas de acordo com cada pesquisador, como pode ser observado no estudo de Filho et al. (2003), onde as etnias foram separadas em branca, negra e amarela, com porcentagens de indivíduos portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com as seguintes porcentagens, 58,1%, 35,5% e 6,4%, respectivamente.

Entretanto, este predomínio, em muitos casos, não pode ser considerado categórico em virtude da ampla miscigenação da população brasileira e da caracterização subjetiva da etnia de cada indivíduo (CARVALHO et al., 2001). Também deve-se considerar a predominância de etnia na região onde o estudo foi

realizado, e a acessibilidade dos indivíduos aos hospitais para tratamento da neoplasia.

Como já é amplamente conhecido, os hábitos tabagistas e etilistas estão intimamente relacionados com a ocorrência de tumores de cabeça e pescoço, pois tais hábitos tornam o indivíduo suscetível à ocorrência de neoplasia (ANDREOTTI et al., 2006; FORASTIERE, 2001; GILLISON, 2007; INCA 2001). E neste estudo, o mesmo padrão se repetiu. A grande maioria dos pacientes tinha hábitos tabagistas e etilistas.

Na amostra de pacientes estudada, observou-se dois sítios de ocorrência do tumor, a cavidade oral e a orofaringe, áreas com bastante contato às substâncias mutagênicas contidas no álcool e tabaco (BELLO, SOINI e SALO, 2010). Sendo que na orofaringe, a localização do tumor foi no palato e na tonsila, e na cavidade oral, a maior incidência do tumor foi na língua, dado também relatado por Gillison et al. (2007).

Tabela 2: Frequência da ocorrência de sítios e subsítios acometidos com o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em pacientes utilizados neste estudo.

Sítio Acometido	Frequência	Porcentagem
Orofaringe		
Pálato	1	2,27%
Tonsila	1	2,27%
Cavidade Oral		
Língua	17	38,63%
Gengiva	7	15,90%
Soalho	14	31,81%
Outro	4	9,1%
Total	44	100%

Como demonstrado na Tabela 2, uma mínima porcentagem de ocorrência do tumor foi no sítio de orofaringe com 4,54% dos casos (somatório de todos os subsítios da orofaringe), enquanto a maior parte dos sítios acometidos pelo tumor foi na cavidade oral, com 95,46% (somatório de todos os sítios da cavidade oral). Sendo que 38,63% de todos os pacientes observados apresentaram o carcinoma epidermóide na língua, seguido por 15,90% na gengiva.

Alvarenga et al. (2003) estudou mais sítios anatômicos para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em 427 pacientes, como cavidade oral (35,37%), laringe (31,15%), orofaringe (16,15%), hipofaringe (8,43%), nasofaringe (1,88%) e outros (7,02%). nota-se que os pesquisadores apresentaram dados semelhantes em relação ao sítio acometido pela neoplasia, onde a maioria dos pacientes apresentou a neoplasia na cavidade oral, com 35,37% dos casos, enquanto 15,15% apresentou neoplasia na Orofaringe.

4.2 Análise de expressão da HIF-1 α

A análise microscópica revelou que dos 44 pacientes analisados, 40 (90.9%) apresentaram expressão positiva de HIF-1 α em linfócitos, dentre qualquer um dos três tipos de intensidade de marcação. A Figura 4 mostra as diferentes intensidades de expressão da HIF-1 α em linfócitos na região peritumoral.

A expressão positiva em 90,9% dos pacientes pode ser explicada pela ativação das vias dependentes de oxigênio, ou seja, a não-hidroxilação efetuada pelas PHDs e conseqüente, a não degradação proteossomal da HIF-1 α (WALMSLEY et al., 2011), as ativações por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DEHNE e BRUNE, 2009) e também pelas vias independentes do oxigênio ativadas pelas citocinas no microambiente inflamatório (DEHNE e BRUNE, 2009; SCHARTE et al., 2003; THIEL et al., 2007). Já a expressão negativa em quatro dos pacientes estudados pode indicar que o microambiente ainda não estava hipóxico (HUANG et al., 1996; KALLIO et al., 1997; SCHARTE, 2003; SEMENZA, 1999), tampouco ocorreram as vias internas de ativação da HIF-1 α no interior dos linfócitos (DEHNE e BRUNE, 2009).

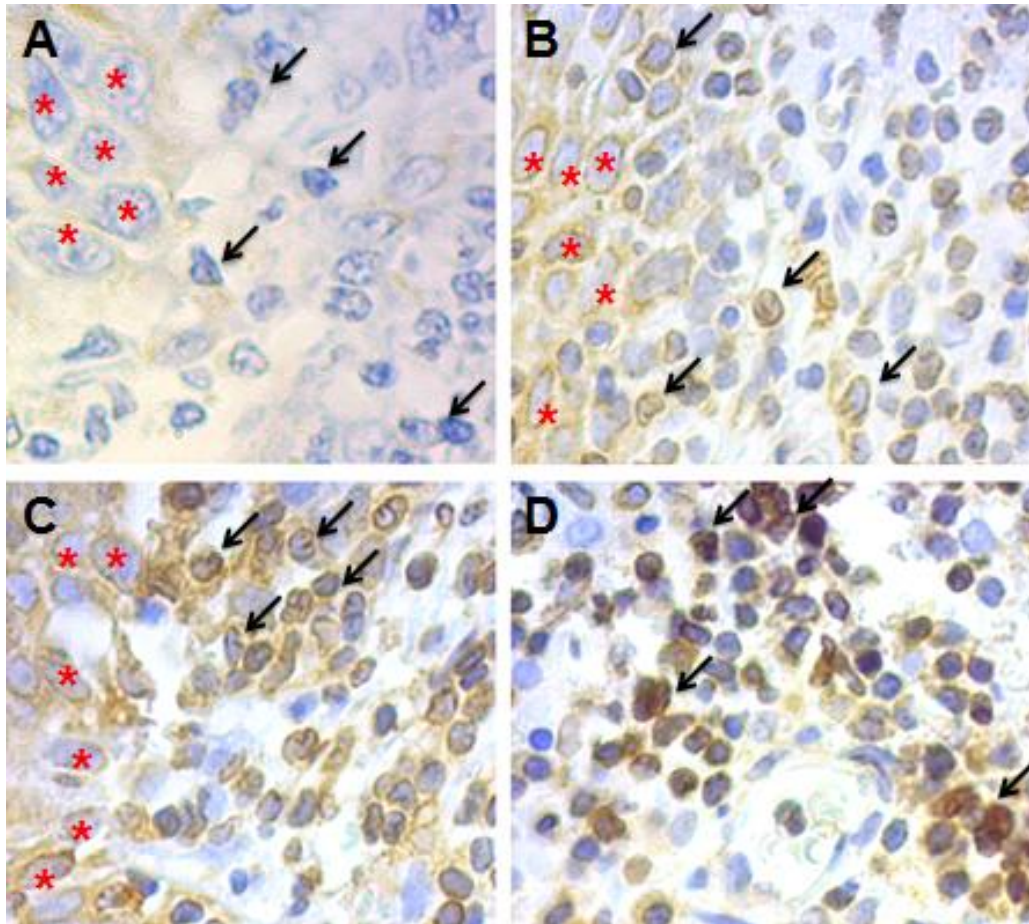


Figura 4: Fotomicrografia em lente objetiva de 40x de margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Tipos de intensidade de marcação de Linfócitos para a proteína HIF -1 α , onde os linfócitos imunorreativos são marcados por setas e as células neoplásicas são marcadas por asteriscos. A) A figura apresenta alguns linfócitos sem marcação B) Linfócitos fracamente marcados C) Linfócitos moderadamente marcados D) Linfócitos fortemente marcados.

De acordo com o que foi proposto na metodologia, foi realizado o somatório do número de linfócitos imunorreativos nas diferentes intensidades em todos os pacientes analisados, a maior porcentagem de células imunomarcadas foi de intensidade moderada (69,1%), seguida de intensidade fraca (27,8%), enquanto a intensidade forte teve uma baixa taxa de ocorrência (3,1%).

Observou-se que houve significância na intensidade de expressão de HIF-1 α nos linfócitos dos pacientes analisados ($p < 0.0001$). A intensidade de marcação que mais se destacou foi a moderada, seguida de fraca e forte. As intensidades moderada e fraca não se diferiram significativamente, entretanto, ambas se

diferiram. A Figura 5 demonstra o percentual de linfócitos imunorreativos nas diferentes intensidades de expressão de HIF-1 α .

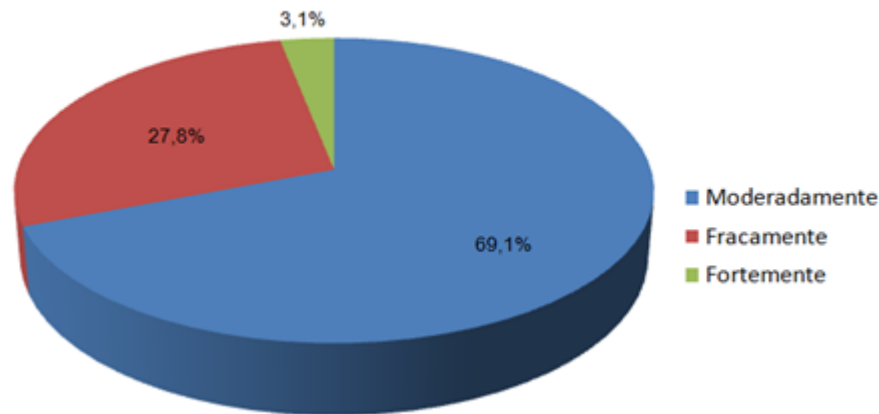


Figura 5: Distribuição do percentual de linfócitos imunomarcados referentes à intensidade de expressão da proteína HIF-1 α na margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

As intensidades de marcação nos dão um panorama de como o metabolismo celular se procede, é de se esperar que um maior metabolismo das citocinas que promovem “*upregulation*” de HIF-1 α resulte numa marcação mais intensa, enquanto uma “*downregulation*” resulta em pouca ou nenhuma marcação de HIF-1 α . Como os tipos de regulação de HIF-1 α em células inflamatórias são bem diversos, vários serão os fatores para aumentar ou reduzir o acúmulo desta proteína nas células. Foi visto em estudos anteriores que este acúmulo pode ocorrer tanto em normóxia devido a regulação por citocinas (FREDE, 2005; LUKASHEV e SITKOVYSKY, 2008; SCHARTE, 2003), como em hipóxia pela produção de espécies de oxigênio e nitrogênio reativos (DEHNE E BRUNNE, 2009). Neste estudo, nota-se que as vias de expressão da HIF-1 α foram mediadas tanto em hipóxia como em normóxia.

Para a análise da idade na expressão de HIF-1 α os pacientes foram agrupados em em três categorias, e as mesmas foram relacionadas com o número e intensidade de células imunomarcadas. Observou-se que houve relação significativa entre estes dados, com um valor $p < 0,0001$.

Indivíduos com idade ≤ 45 anos são menos acometidos pelo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (ALVARENGA et al., 2008; GILLISON et al., 2007), então o somatório de células imunomarcadas para esta categoria foi menor

do que as outras, de forma que este reduzido número de linfócitos imunorreativos foi decorrente do baixo número de indivíduos acometidos pelo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço nesta categoria de idade. No entanto, como o número de linfócitos é dependente de fatores individuais do paciente (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007; BENJAMINI, COICO e SUNSHINE, 2002), o somatório de células imunomarcadas pode se alterar.

Por outro lado, os indivíduos de 45 a 65 anos obtiveram elevado valor de somatório de células imunomarcadas, com a marcação moderada mais expressiva. Por fim, os indivíduos com idade ≥ 66 semelhantemente à primeira categoria, apresentaram baixa taxa de células imunomarcadas pelos três tipos de intensidade de expressão da HIF-1 α .

A marcação moderada foi a intensidade que apresentou maiores taxas nas três categorias de idade, seguidas por fraca e forte. A Figura 6 ilustra o somatório de células dos pacientes separados em cada categoria de idade de acordo com a intensidade de expressão da HIF-1 α .

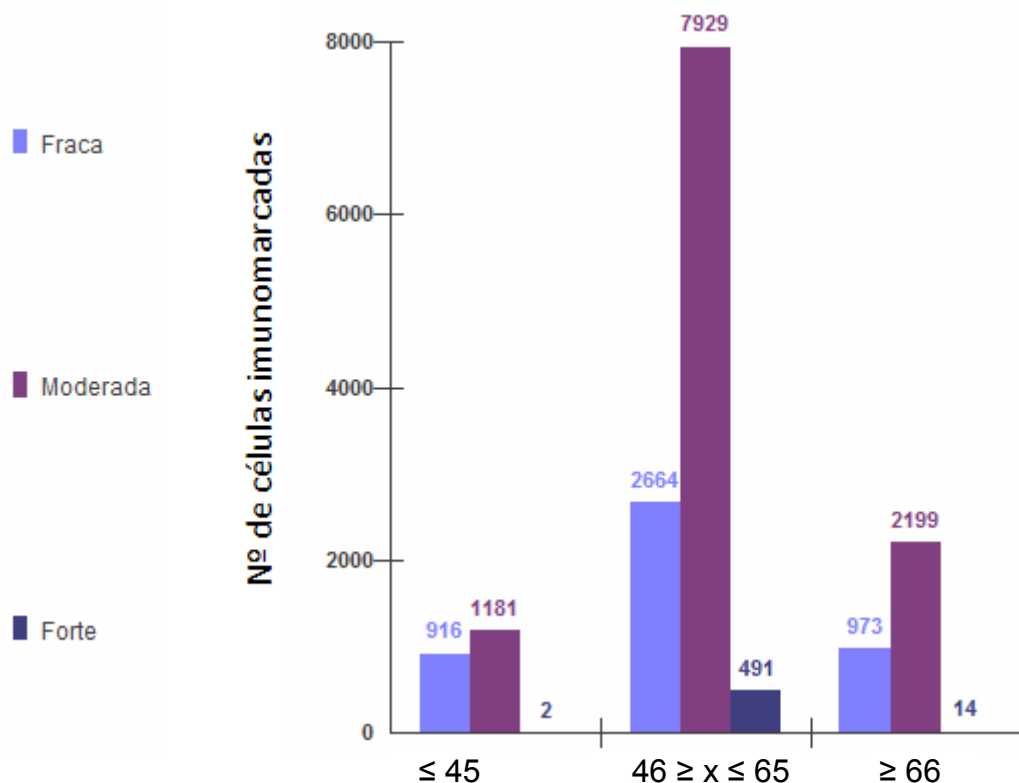


Figura 6: Gráfico representativo do número de linfócitos imunorreativos dentro de cada intensidade de expressão da proteína HIF-1 α em margem cirúrgica de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, conforme faixa etária.

Tais valores ocorreram, pelo fato da faixa etária entre 46 e 65 anos estarem contidos o maior número de pacientes (25 indivíduos), portanto o maior número de células imunomarcadas contadas pertenciam à essa categoria. Como geralmente o tumor incide em indivíduos desta idade, é de se esperar que a maior representatividade de Linfócitos T imunorreativos também ocorra nesta idade, para que possam exercer o papel de supressão das células neoplásicas (ABBAS e LICHTMAN, 2007; FALLON et al., 2002; KOBAYASHI et al., 1998; TERABE, PARK e BERZOFSKY, 2004), lembrando que outros fatores podem influenciar no número de linfócitos presentes na margem do tumor, como fatores individuais e também as células T_H2 (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007; BENJAMINI, COICO e SUNSHINE, 2002; IJIMA et al., 1999; SCHARTE et al., 2003).

Em relação à distribuição da HIF-1 α , houve 28,96% de expressão no núcleo e 71,04% no citoplasma. Houve diferença na distribuição da HIF -1 α em relação à localização na célula ($p < 0.0001$), sendo a marcação da proteína esteve significativamente mais presente no citoplasma, em relação ao núcleo, conforme se observa na Figura 7.

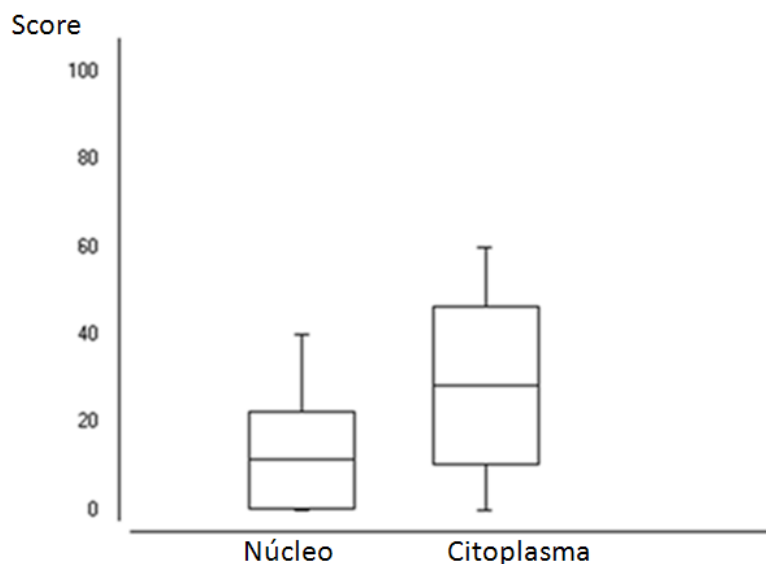


Figura 7: Gráfico Box-Plot mostrando a distribuição de localização da proteína HIF-1 α em relação ao núcleo e citoplasma, com suas respectivas médias e desvio padrão.

A marcação de HIF-1 α no núcleo indica que a mesma não foi ubiquitinada pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau) e tampouco degradada no proteossomo, e por isso a proteína fica livre para se deslocar até a região nuclear (HUANG et al., 1996; KALLIO et al., 1997; SEMENZA, 1999). Acredita-se a célula T tanto pode estar sofrendo efeitos da hipóxia ou de outras citocinas que irão inibir essa degradação e permitir que a HIF-1 α se dimerize com a HIF-1 β para formar o complexo HIF-1 e servir como fator de transcrição de uma série de genes como metabolismo celular, angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose, glicólise entre outros (HARRIS 2000; HUANG et al., 1996; KALLIO et al., 1997; SCHARTE, 2003; SEMENZA, 1999; SEMENZA 2002; SEMENZA 2003).(Figura 8)

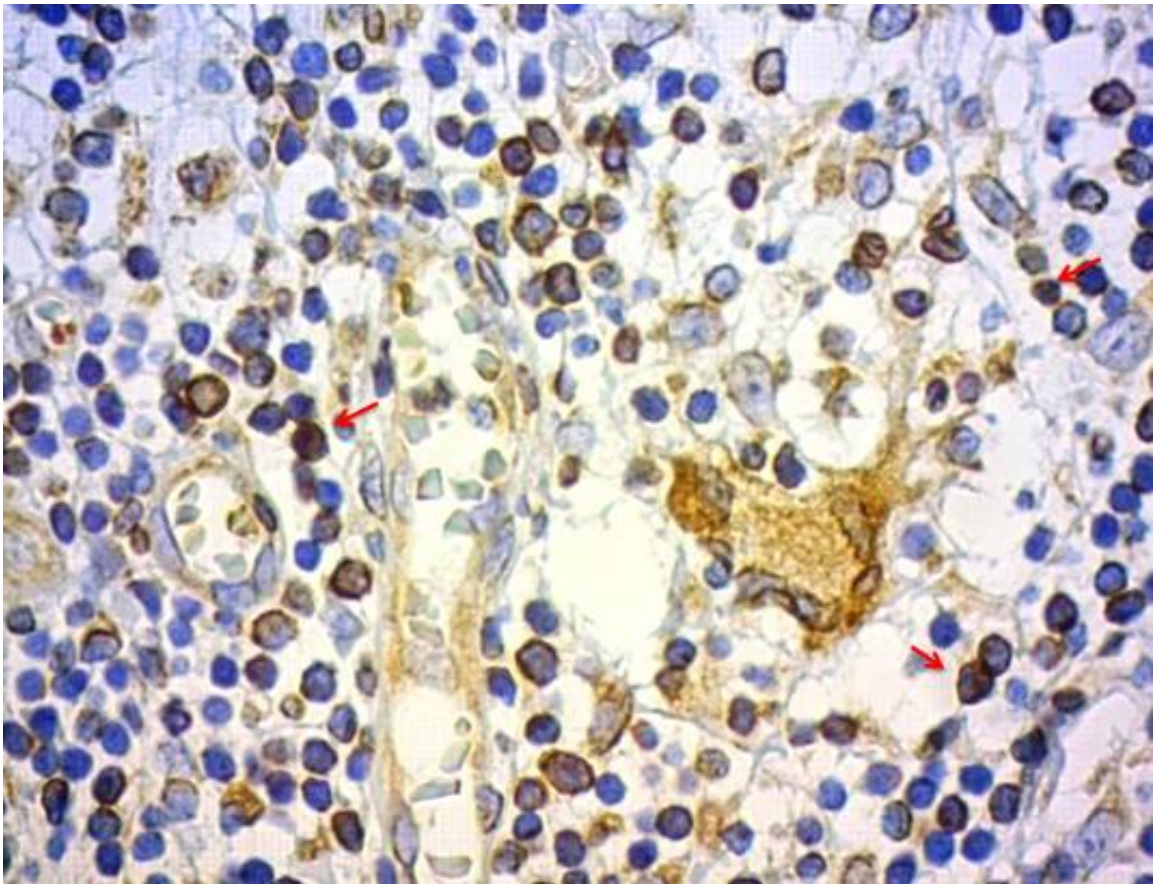


Figura 8 Fotomicrografia em lente objetiva de 40x de linfócitos na margem cirúrgica peritumoral evidenciando a marcação HIF-1 α nos núcleos das células T indicados pelas setas.

Por outro lado, a marcação da HIF-1 α preferencialmente no citoplasma, pode sugerir que muitos processos de transcrição e tradução desta proteína estejam

ocorrendo além do normal, com a ativação das citocinas e espécies de oxigênio e nitrogênio reativos (DEHNE e BRUNNE, 2009). Como a tradução das proteínas ocorre no citoplasma, é de se esperar que neste momento a prevalência da marcação esteja no citoplasma.

Segundo Frede et al. (2005), a IL- β o TNF α , fatores de crescimento e adenosina, ativam PI3K e AKT que estimulam a tradução de HIF-1 α , e por mais que esta proteína seja constantemente degradada em condições de normóxia, o aumento da tradução desta proteína pode alterar o balanço da taxa da mesma (DEHNE e BRUNE, 2009), além do que em tecidos inflamados, outras vias são responsáveis pela degradação das proil hidroxilases (PHDs) que em condições de normóxia estas teriam a função de hidroxilar a HIF-1 α e em sequência esta seria degradada no proteossomo (SITKOVSKY e LUKASHEV, 2005). (Figura 9)

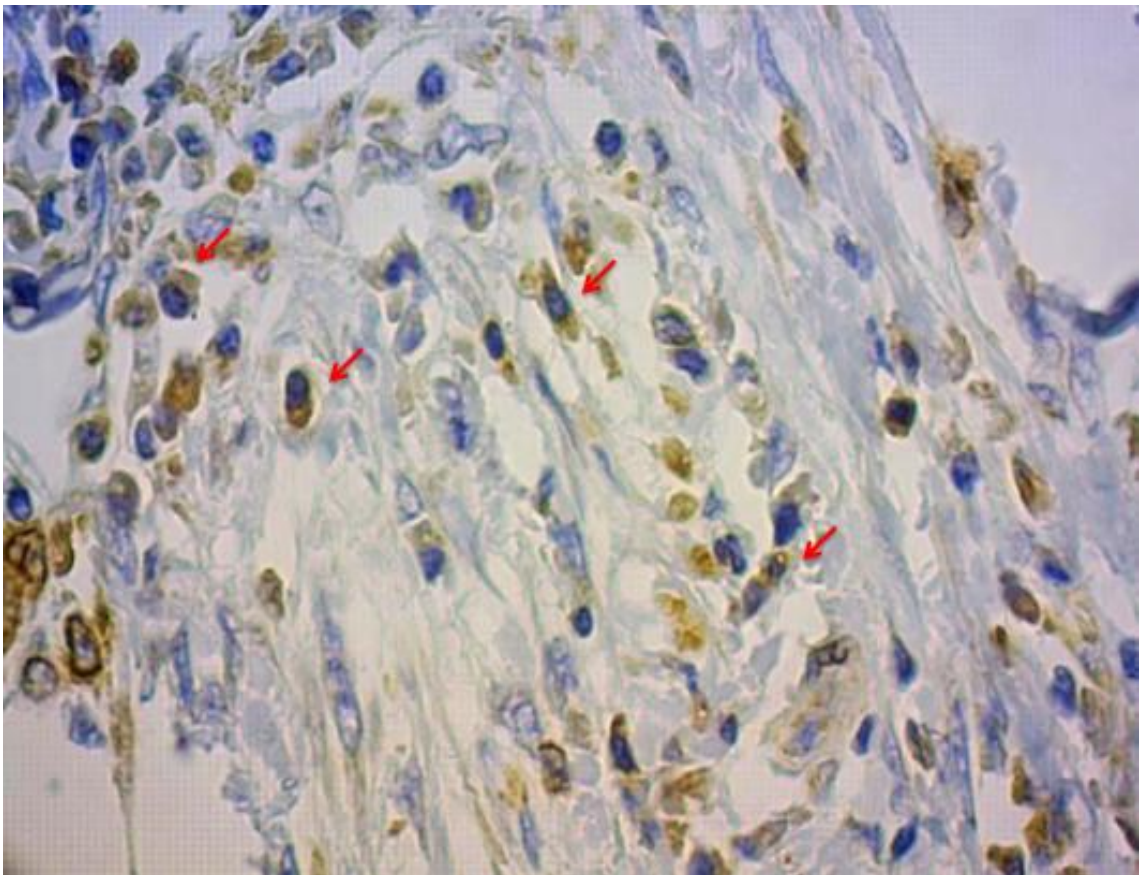


Figura 9: Fotomicrografia em lente objetiva de linfócitos em margem cirúrgica peritumoral que ilustra a localização da proteína HIF-1 α no citoplasma dos linfócitos.

Ao se comparar a expressão de HIF-1 α com a recidiva local do tumor, notou-se que os indivíduos que tiveram recidiva apresentaram um maior número de células imunomarcadas, enquanto que indivíduos que não tiveram recidiva apresentaram menores índices de células imunomarcadas. Isto ocorre porque a HIF-1 α induz vias de secreção de citocinas anti-inflamatórias pelas T_{H2}, e então as atividades antitumorais dos linfócitos TCD8⁺ são reduzidas (SCHARTE et al., 2003), desta forma o tumor ganha uma capacidade maior de desenvolvimento e recidiva.

Thiel et al. estudaram em 2007 que a deficiência de HIF-1 α em células T resultava no aumento da resposta antibacteriana, ou seja, quando a HIF-1 α está sendo expressa nas T_{H2}, essa induz as vias anti-inflamatórias dos linfócitos, enquanto a não expressividade da HIF-1 α nas células T resulta num aumento da resposta imune contra os invasores, inclusive o tumor.

Pôde-se notar que a expressão de HIF-1 α influencia significativamente na recidiva do tumor ($p < 0.0001$), de modo que a intensidade forte tem maior probabilidade de influir na recidiva local do tumor, visto que uma elevada intensidade de expressão de HIF-1 α nas células estudadas resulta em um decréscimo do combate ao tumor. A Tabela 3 demonstra a relação da expressão da HIF-1 α com a recidiva e sobrevida dos pacientes, relacionando o somatório das células originárias de cada intensidade de marcação para as categorias de *status* de sobrevida e recidiva local.

Tabela 3: Relação das características prognósticas sobrevida e recidiva local, de acordo com as intensidades de marcação.

Características prognósticas	Expressão de HIF-1 α			p valor
	Fracamente	Moderadamente	Fortemente	
Status de Vida				
Vivo	3040	7401	241	<0.0001
Morto	1513	3908	266	
Recidiva Local				
Sim	1242	2496	172	<0.0001
Não	3311	8813	335	

O prontuário dos pacientes estudados revela que dos 14 indivíduos que apresentaram recidiva local, apenas quatro pararam de fumar. O que demonstra que o tratamento não pôde ser tanto eficaz, como seria se os pacientes cessassem o hábito tabagista, visto que pacientes que permanecem fumando durante o tratamento apresentam menores índices de resposta, pois aumenta as chances de recidiva do tumor, e diminui a probabilidade de sobrevida em comparação aos pacientes que param com o hábito tabagista (INCA, 2001).

Ao ponderar se a localização da HIF-1 α interferiu na recidiva local do tumor, foi observado que não houve diferença significativa na influência da localização desta proteína, em relação ao núcleo e citoplasma, na recidiva do tumor ($p = 0,1384$). Portanto a recidiva é independente da localização da HIF-1 α no linfócito.

Observou-se que a expressão da HIF-1 α interfere significativamente na sobrevida dos pacientes estudados. De forma que à medida que a intensidade de marcação aumenta, o número de mortes também aumenta, em contrapartida o maior número de sobrevida corresponde com marcações de fraca a moderada. Nota-se que assim como a recidiva, a sobrevida acompanha o metabolismo da T_H2. Onde uma maior intensidade de marcação de HIF-1 α nestas células ativa vias anti-inflamatórias dessa, havendo portanto uma redução da resposta imune dos linfócitos TCD8⁺ e combate ao tumor. Este, por outro lado continuará a se desenvolver e agredir o organismo do hospedeiro, podendo resultar em morte do mesmo.

Estes dados estão de acordo com Lin et al., (2008) e Aebersold et al.(2001), os quais observaram que a marcação forte de HIF-1 α no tumor estava relacionada com a redução da sobrevida dos pacientes, e contradizem os informações de Beasley et al. (2002) e Fillies et al. (2005) que encontraram uma relação entre células fortemente marcadas e um aumento da sobrevida. Entretanto, todos esses estudos citados foram exercidos em células neoplásicas, enquanto o presente estudo contemplou a expressão desta proteína em Linfócitos T.

Já Thiel et al. (2005) analisaram a expressão de HIF-1 α em Linfócitos T, e observaram que a intensidade de marcação de HIF-1 α fraca estava relacionada com o aumento da sobrevida de ratos.

Todos estes estudos comprovam as diferentes funções da proteína HIF-1 α em cada célula onde a mesma se encontra. Em células tumorais, esta proteína formará o complexo HIF-1 para a transcrição de genes, que aumentem a agressividade do tumor, como o VEGF, responsável pela angiogênese (HARRIS, 2000; SEMENZA, 2002; SEMENZA 2003).

Já em células mielóides mesma proteína terá a função de otimizar a resposta imune, sendo responsáveis pela expressão de diversos genes como a angiogênese no microambiente inflamatório e glicólise, para aumentar o potencial das células inflamatórias (DEHNE e BRUNE, 2009), e por fim, em células T_{H2}, a HIF-1 α será responsável por ativar vias anti-inflamatórias, como a ativação de IL-4 e IL-10, reduzindo a resposta imune (SCHARTE et al., 2003; THIEL et al., 2007).

Como discutido anteriormente, o aumento de HIF-1 α em células T_{H2} tem ação anti-inflamatória, e assim reduz a resposta contra os patógenos, incluindo o tumor. Então pacientes que não tiveram uma boa resposta contra o câncer acabaram falecendo.

De forma geral no estudo, a proteína HIF-1 α foi expressa na maioria dos pacientes analisados, com predominância da intensidade de expressão moderada. A expressão desta proteína na célula depende de uma série de fatores que inibem ou induzem sua expressão.

Uma vez expressa, a proteína HIF-1 α tem importante papel no metabolismo celular, de forma que em células neoplásicas, sua expressão resulta num aumento do tumor em virtude da angiogênese, já em células mielóides peritumorais a HIF-1 α tem função de otimizar a resposta imune antitumoral, e por fim, nas células linfóides, especialmente nas células T_{H2}, a HIF-1 α irá mediar a atividade anti-inflamatória da célula. Portanto, a proteína HIF-1 α apresenta diferentes funções de acordo com a célula em que é expressa.

5 CONCLUSÕES

Houve expressão de HIF-1 α em linfócitos da margem cirúrgica em linfócitos dos pacientes humanos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço estudados.

A HIF-1 α está presente em sua maioria no citoplasma de linfócitos da margem cirúrgica de pacientes humanos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

A HIF-1 α foi mais expressa em pacientes com idade entre 46 a 65 anos.

A intensidade de expressão de HIF-1 α mais presente nas células foi a moderada.

A expressão forte de HIF-1 α em linfócitos indica um menor *status* de sobrevida dos pacientes e elevada chance de desenvolver recidiva.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se o uso de marcadores de Linfócitos T CD4⁺ E T CD8⁺ adicionalmente com o marcador de HIF-1 α em imunistoquímica de fluorescência, para evidenciar melhor, o metabolismo do microambiente inflamatório de cada paciente.

Novos estudos podem utilizar a análise de margem de tumores por meio da técnica de imunistoquímica com o anticorpo específico para HIF-1 α , para se obter um prognóstico para cada paciente, e assim, a otimização do tratamento dos mesmos.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição, São Paulo, Elsevier Editora Ltda. 2007.

AEBERSOLD DM, BURRI P, BEER KT, et al. **Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer**. *Cancer Res*. 2001; 61(7):2911-6.

ALVARENGA, L. M., RUIZ, M. T., BERTELLI, E. C. P., RUBACK, M. J. C. MANIGLIA, J. V., BERTOLLO, E. M. G. **Avaliação epidemiológica de pacientes com cancer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo**. *Ver Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(1): 68-73.

AMORIM FILHO FS. **Estudo de variáveis demográficas, ocupacionais e co-carcinogênicas no carcinoma espinocelular da base de língua nas mulheres**. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(4):472-78.

ANDREOTTI, M., RODRIGUES, A.N., CARDOSO, L.M.N., FIGUEIREDO, R.A.O., ELUF-NETO, J. **Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe**. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2006; 22(3):543-552.

BAEK JH, LIU YV, MCDONALD KR, WESLEY JB, HUBBI ME, BYUN H, SEMENZA GL. **Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1 α** . *J Biol Chem*. 2007; 282: 23572–23580.

BAEK JH, MAHON PC, OH J, KELLY B, KRISHNAMACHARY B, PEARSON M, CHAN DA, GIACCIA AJ, SEMENZA GL. **OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α** . *Mol Cell*.2005; 17: 503–512.

BEASLEY NJ, LEEK R, ALAM M, et al. **Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients**. *Cancer Res*. 2002; 62:2493-7.

BELLO IO, SOINI Y e SALO T. **Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives(II)**. *Oral Oncol*. 2010; 46:636-43.

BENJAMINI, E., COICO, R. e SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002.

BLOT WJ, MCLAUGHLIN JK, WINN DM, AUSTIN DF, GREENBERG RS, PRESTON-MARTIN S et al. **Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer**. *Cancer Res* 1998; 48:3282-7.

BLOUIN, C.C., PAGE, E.L., SOUCY, G.M. e RICHARD, D.E. **Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha**. *Blood*. 2004; 103, 1124–1130.

BRADLEY PJ, RAGHAVAN U. **Cancer presenting in the head and neck during pregnancy.** *Curr Opin Otolaryngol & Head Neck Surg* 2004;12:76-81.

BRAHIMI-HORN C, MAZURE N, POUYSSEGUR J. **Signalling via the hypoxia inducible factor-1alpha requires multiple post translational modifications.** *Cell Signal.* 2005; 17:1-9.

BRANDWEIN-GENSLER M, TEIXEIRA MS, LEWIS CM, LEE B, ROLNITZKY L, HILLE JJ, et al. **Oral squamous cell carcinoma. Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival.** *Am J Surg Pathol.* 2005;29(2):167-78.

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

BRUICK RK e MCKNIGHT SL. **A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.** *Science.* 2001; 294:1337-40.

BRUICK RK. **Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(16):9082-7.

BRUICK RK. **Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor.** *Genes Dev.* 2003; 17(21):2614-23

BRUNE, B. e ZHOU, J. **Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling.** *Cardiovasc.* 2007; 75 275–282.

BRYNE K, KOPPANG HS, LILLENG R, STENE T, BANG G, DABELSTEEN E. **New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas.** *J Oral Pathol Med.* 1989;18:432-37.

BUNN HF, POYTON RO. **Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.** *Physiol Rev.* 1996; 76:839-85

CARMELIET P, DOR Y, HERBERT JM, FUKUMURA D, BRUSSELMANS K, et al. **Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.** *Nature.* 1998; 394: 485–490.

CARVALHO AL, IKEDA MK, MAGRIN J. **Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in single institution.** *Oral Oncol.* 2004;40:71-76.

CARVALHO MB, LENZI J, LEHN CN, FAVA AS, AMAR A, KANDA JL, WALDER F, MENEZES MB, FRANZI AS, MAGALHÃES MR, CURIONI OA, MARCEL R, SZELIGA S, SOBRINHO J, RAPOPORT A. **Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino.** *Rev. Assoc Med Bras* 2001;47:208-14.

CHOWDHURY R, HARDY A, SCHOFIELD CJ. **The human oxygen sensing machinery and its manipulation.** Chem Soc Rev. 2008; 37:1308–1319.

COCKMAN ME, MASSON N, MOLE DR, et al. **Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** J Biol Chem. 2000; 275(33):25733-41.

COJOCARIU, O. M.; HUGUET, F.; LEFEVRE, M.; PÉRIÉ, S. **Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers.** Bull Cancer. 2009; 96:4:369-78.

CRAMER T, YAMANISHI Y, CLAUSEN BE, FORSTER I, PAWLINSKI R, et al. **HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation.** Cell. 2003; 112: 645–657.

DEHNE, N. e BRUNE, B. **HIF-1 in the inflammatory microenvironment.** Exp. Cell. 2009; 315:1791-1797.

DEWHIRST, M.W., LI, C.Y. **Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation.** Mol. Cell. 2007; 63–74.

EPSTEIN AC, GLEADLE JM, MCNEILL LA, et al. **C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.** Cell. 2001; 107:43-54. 55

FALLON PG, JOLIN HE, SMITH P, EMSON CL, TOWNSEND MJ, FALLON R, MCKENZIE AN **IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9 e IL-13.** Immunity. 2002; 17:7.

FILLIES T, WERKMEISTER R, DIEST PJV, et al. **HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor.** BMC Cancer. 2005; 5:84

FORASTIERE A, KOCH W, TROTTI A, et al. **Head & Neck Cancer.** The New England J of Med. 2001; 345(26):1890-1990.

FOWELL, D., MCKNIGHT, A.J., POWRIE, F., DYKE, R. e MASON, D. **Subsets of CD4⁺ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity.** Immunol Rev, 1991; 123:37.

FRANCO EL, KOWALSKI LP, OLIVEIRA BV, CURADO MP, PEREIRA RN, SILVA ME et al. **Risk factors for oral cancer in Brazil: A case-control study.** Int. J. Cancer 1989; 43:992-1000.

FREDE, S., FREITAG, P., OTTO, T., HEILMAIER, C., FANDREY, J. **The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation.** Cancer Res. 2005; 65 4690–4697.

FREEMAN HP. **Poverty, culture, and social injustice: determinants of cancer disparities.** CA Cancer J Clin. 2004; 54(2):72-7. 51

GERALD, D., BERRA, E., FRAPART, Y.M., CHAN, D.A., GIACCIA, A.J. MANSUY, D., POUYSSEGUR, J., YANIV, M., Mehta-Grigoriou, F. **JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress.** Cell. 2004; 118 781–794

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

GIORDANO FJ, JOHNSON RS. **Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch.** Curr Opin Genet Dev. 2001; 11:35-40. 53

HADDAD, J.J. e LAND, S.C. **A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1 α .** FEBS Letters. 2001; 505 269-274.

HARRIS A.L. **Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth.** Nat Rev Cancer. 2004; 2 (1): 38-47.

HARRIS AL. **Von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy.** Oncologist. 2000; 5S1:32-6.

HELLWIG-BURGEL, T., RUTKOWSKI, K., METZEN, E., FANDREY, J. e JELKMANN, W. **Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.** Blood. 1999; 94, 1561–1567.

HUANG LE, ARANY Z, LIVINGSTON DM, et al. **Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit.** J Biol Chem. 1996; 271:32253-9.

HUANG LE, BUNN HF. **Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance.** J Biol Chem. 2003; 278(22):19575-8.

IJIMA, H., TAKAHASHI, I., KISHI, D., KIM, J.K., KAWANO, S., HORI, M. AND KIYONO, H. **Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice.** J. Exp. Med. 1999; 190, 607–615.

INCA Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008/09: incidência de câncer no Brasil.** Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2008; www.inca.gov.br.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008/09: incidência de câncer no Brasil.** Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. 2010; www.inca.gov.br.

INCA. **Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2001, 47(4): 361-76

IVAN M, HABERBERGER T, GERVASI DC, et al. **Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor.** Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(21):13459-64.

IVAN M, KONDO K, YANG H, et al. **HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.** Science. 2001; 292(5516):464-8.

IYER NV, KOTCH LE, AGANI F, et al. **Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α .** Genes Dev. 1998; 12:149-62.

JAAKKOLA P, MOLE DR, TIAN YM, et al. **Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.** Science. 2001; 292(5516):468-72.

KAELIN WG JR, RATCLIFFE PJ. **Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway.** Mol Cell 30: 393–402, 2008.

KALLIO PJ, PONGRATZ I, GRADIN K, et al. **Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor.** Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:5667-72.

KALLIO PJ, WILSON WJ, O'BRIEN S, et al. **Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway.** J Biol Chem. 1999; 274(10):6519-25.

KOBAYASHI M, KOBAYASHI H, POLLARD RB, SUZUKI F. **A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma.** J Immunol. 1998; 160:5869.

KOPKE LFF, BASTOS JCF, ANDRADE FILHO JS, GOUVÊA PS. **Margem de segurança: um conceito antigo e relativo.** An Bras Dermatol. 2005;80:279-86.
LANDO D, PEET DJ, GORMAN JJ, et al. **FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.** Genes Dev. 2002; 16:1466-71.

LANDO D, PEET DJ, WHELAN DA, et al. **Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch.** Science. 2002; 295:858-61.

LAUGHNER, E., TAGHAVI, P., CHILES, K., MAHON, P.C., e SEMENZA, G.L. **Her2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.** Mol. Cell. Biol. 2001; 21: 3995–4004.

LEE, J. W.; BAE, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, K. W. **Hypoxia-Inducible Factor: its proteinsability and biological functions.** Exp. Mol. Med.2004; 36:1-12.

LI H, KO HP, WHITLOCK JP. **Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1alpha.** J Biol Chem. 1996; 271:21262-7.

LIN PY, YU CH, WANG JT, et al. **Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan.** J Oral Pathol Med. 2008; 37(1):18-25.

LOURENÇO SQC, SCHUELER AF, CAMISASCA DR, LINDENBLATT RC, BERNARDO VG. **Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos.** Revista Brasileira de Cancerologia. 2007;53(3):325-33.

LUKASHEV, D. e SITKOVSKY, M. **Preferential expression of the novel alternative isoform 1.3 of hypoxia-inducible factor 1 α in activated human T lymphocytes.** Human Immunology. 2008; 69, 421-425

MAHON PC, HIROTA K, SEMENZA GL. **FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.** Genes Dev 15: 2675–2686, 2001.

MASSON N, WILLAM C, MAXWELL PH, et al. **Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation.** Eur Mol Biol Organ J. 2001; 20:5197-206.

MAXWELL PH, DACHS GU, GLEADLE JM, et al. **Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.** Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:8104-9.

MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, et al. **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** Nature. 1999; 399:271-5.

MILLER CS, HENRY RG, RAYENS MK. **Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 95(5):570-75.

MIRRA AP, LATORRE MR, VENEZIANO DB. **Incidência de Câncer no Município de São Paulo, Brasil: 1997-1998.** Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2001. Disponível em <http://www.fsp.usp.br/rcsp/rcsp1.pdf>, acessado em 30/04/2011.

OLAS, G., DUTRA, R.A., TARTAGLIA, S.M.A., VASCONCELOS, W.A., BARBOSA, A.A., AGUIAR, M.C.F. **Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian Population.** Braz Dent J. 2001;12(1):57-61.

OZER A, BRUICK RK **Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one?** Nat Chem Biol. 2007; 3: 144–153.

PAPANDREOU, I.; POWELL, A.; LIM, A. L.; DENKO, N. **Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment.** *Mutat.* 2005; 569:87-100.

PEREZ-ORDEÑEZ B, BEAUCHEMIN M, JORDAN RCK. **Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Clin Pathol.* 2008; 59:445-453.

PUGH CW, O'ROURKE JF, NAGAO M, et al. **Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit.** *J Biol Chem.* 1997; 272:11205-14.

RANTANEN, K., PURSIHEIMO, J., HÖGEL, H., HIMANEN, V., METZEN, E., JAAKKOLA, P. M. **Prolyl Hydroxylase PHD3 Activates Oxygen-dependent Protein Aggregation.** *Molecular Biology of the Cell.*2008; 19:2231-2240.

RUAS JL, POELLINGER L, PEREIRA T. **Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein.** *J Biol Chem.* 2002; 277:38723-30.

RYAN HE, POLONI M, MCNULTY W, et al. **Hypoxia-inducible factor-1a is a positive factor in solid tumor growth.** *Cancer Res.* 2000; 60:4010-4015.

SAKAGUCHI, S., e SAKAGUCHI, N. **Thymus, T cells and autoimmunity: various causes but a common mechanism of autoimmune disease.** In *Autoimmunity: Physiology and Disease.* Wiley-Liss, New York. 1994.

SALCEDA S, CARO J. **Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.** *J Biol Chem.* 1999; 272(36):22642-7.

SCHARTE, M., HAN, X., BERTGES, D.J., FINK, M.P. AND DELUDE, R.L. **Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; 284, 373–384.

SCHÖDER H, FURY M, LEE N, KRAUS D. **Monitoring of therapy response in head and neck squamous cell carcinoma.** *J Nucl Med. Pet* 2009 1:74-88.

SEMENZA GL **Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.** *Annu Rev Cell Dev Bio.* 1999; 15: 551–78.

SEMENZA GL. **HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics.** *Trends Mol Med.* 2002; 8:S62-7.

SEMENZA GL. **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(10):721-32.

SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S. e SAKAGUCHI, S. **Induction of Tumor Immunity by Removing CD25⁺ CD4⁺ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity.** J Immunol 1999; 163:5211-5218

SITKOVSKY MV, LUKASHEV D, APASOV S, KOJIMA H, KOSHIBA M, et al. **Physiological Control of Immune Response and Inflammatory Tissue Damage by Hypoxia-Inducible Factors and Adenosine A2A Receptors.** Annu Rev Immunol. 2004; 22: 657–82.

SITKOVSKY, M., E LUKASHEV, D. **Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF-1 α and adenosine receptors.** Nat. Rev. Immunol. 2005; 5: 712–721.

SONVEAUX, P., VEGRAN, F., SCHROEDER, T., WERGIN, M.C., VERRAX, J., RABBANI, Z.N., SAEDELEER, C.J., KENNEDY, K.M. et al. **Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice.** The Journal of Clinical Investigation. 2008; 12 v.118

SRINIVAS V, ZHANG LP, ZHU XH, et al. **Characterization of an oxygen/ redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIFalpha) proteins.** Biochem Biophys Res Commun. 1999; 260:557-61.

STIEHL DP, WIRTHNER R, KÖDITZ J, et al.. **Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels: evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system.** J Biol Chem. 2006; 281(33):23482-91.

TALKS KL, TURLEY H, GATTER KC, et al. **The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages.** Am J Pathol. 2000; 157:411-21.

TANIMOTO K, MAKINO Y, PEREIRA, et al. **Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** EMBO J. 2000; 19(16):4298-309

TERABE, M, PARK, JM, BERZOFSKY, JA. **Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth.** Cancer Immunol. Immunother.2004. 53:79-85.

THIEL M, CALDWELL CC, KRETH S, KUBOKI S, CHEN P, et al. **Targeted Deletion of HIF-1a Gene in T Cells Prevents their Inhibition in Hypoxic Inflamed Tissues and Improves Septic Mice Survival.** PLoS ONE. 2007; 2(9): e853.
doi:10.1371/journal.pone.0000853

WALKER DM., BOEY G, MCDONALD LA. **The pathology of oral cancer.** Pathology 2003;35:376-83.

WALMSLEY, S. R., CHILVERS, E. R., THOMPSON, A. A., VAUGHAN, K., MARRIOT, H. M., PARKER, L. C., SHAW, G., PARMAR, S., SCHNEIDER, M., et al. **Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice.** The Journal of Clinical Investigation. 2011; .3:121.

WANG GL, JIANG BH, RUE EA, et al. **Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(12):5510-4.

WANG GL, SEMENZA GL. **General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia.** Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:4304-8.

WARD E, JEMAL A, COKKINIDES V, et al. **Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status.** CA Cancer J Clin. 2004; 54(2):78-93.

WEIDEMANN A., JOHNSON, R.S. **Biology of HIF-1alpha.** Cell Death Differ. 2008; 15 621–627.

WENGER RH. **Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.** FASEB J. 2002; 16(10):1151-62.

WIESENER MS, TURLEY H, ALLEN WE, et al. **Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha.** Blood. 1998; 92:2260-8.

ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, et al. **Overexpression of hypoxia-inducible genes.** Cancer Res. 1999; 59:5830-5.

ZHOU, J., SCHMID, T. AND BRUNE, B. **Tumor necrosis factor alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway.** Mol. Biol. Cell. 2003; 14, 2216–2225

ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Presente Trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis, sob nº 619.



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

São Paulo, 10 de Junho de 2008.

APROVAÇÃO

Ao Prezado

Dr. Marcelo dos Santos

Vimos por meio desta informar que o projeto de pesquisa: "Avaliação das proteínas HIF1 α , PHD3 e iNOS como candidatas a marcadores de comportamento tumoral em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe", e seus demais documentos, registrado neste CEP sob nº 619, tendo como relator o Dr. Carlos N. Lehn, foi aprovado por este Comitê de Ética em pesquisa em: 10/06/2008.

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
COORDENADOR

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externa – CEP 04231-030.
Fone: 6215-1001 / 2274-7600 ramal 105 / Fax: 6162-6764
E-mail: cep_heliopolis@yahoo.com.br e Site www.hospitalheliopolis.org.br