



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CATARINA MARIA DE SENA**

**IMUNOEXPRESSÃOIMUNOEXPRESSÃO**

**IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF-1) EM  
CARCINOMA BASOCELULAR**

**SOBRAL  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Curso de Medicina de Sobral

---

S477i Sena, Catarina Maria de.  
Imunoexpressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1) em carcinoma basocelular. / Catarina Maria de Sena. – 2016.  
49 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina *Campus* de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2016.

Área de Concentração: Ciências da saúde.

Orientação: Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira.

Coorientação: Profa. Ma. Leila Carla da Cunha Silva Magalhães.

1. Carcinoma basocelular. 2. Hipóxia celular. I. Título.

---

CDD 614.5999

**CATARINA MARIA DE SENA**

**IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF-1) EM  
CARCINOMA BASOCELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira

**SOBRAL  
2016**

**CATARINA MARIA DE SENA**

**IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF-1) EM  
CARCINOMA BASOCELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira

Aprovada em: 28/03/2016

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Santos  
Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral

---

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto  
Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral

---

Prof. Dr. Marcelo Bonifácio da Silva Sampiere  
Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral

Dedico este trabalho ao meu noivo e futuro  
esposo, José Roberto Frota Gomes Capote  
Júnior.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer acima de tudo a Deus, por ter me dado o presente da aprovação na prova do Mestrado em Ciências da Saúde em Sobral/2014. Agradeço especialmente a minha mãe, Ana Maria de Sena e ao meu pai Geraldo Bernardino de Sena (*In Memoriam*), que embora fisicamente distantes em muitos momentos, deram-me todas as condições de chegar onde estou. Sei que por eles, eu ainda estaria em casa, protegida embaixo de suas asas; mas Deus sempre me proporciona voar alto.

Agradeço ao meu noivo, José Roberto Frota Gomes Capote Júnior, meu maior incentivador ao mestrado, à residência médica, ao melhor de mim. Juntos, tivemos força e ânimo para estudar e revisar os tópicos da prova, não deixar o cansaço e o sono vencer. Meu Amor, somos e sempre seremos vencedores! Você me levou junto neste sonho.

Um agradecimento singelo aos que moraram comigo no Ceará, dentro do meu coração, minha irmã e cunhado, Carina Maria de Sena Machado e Fábio Machado; minha irmã e cunhado Islândia Martins de Maria Araújo e Rubens Pergentino, meus sobrinhos, Renata Maria de Araújo, Rafaela Maria de Araújo, Ryan Maria de Araújo; minha tia mais que especial, Inalda Maria dos Santos; e a minha Cersei que tanto amo e me trouxe tanta alegria.

Agradeço a minha família sobralense que me acolheu com tanto carinho, Dona Tânia e Seu Roberto, Michelle, Eugênio, Sabrina, Andrey, Danielle, Rodolfo, Taninha e José Rodolfo. Também acolhi cada um como minha verdadeira família.

De forma extremamente especial, gostaria de agradecer, com muita honra, respeito e admiração a minha Professora, Karuza Maria Alves Pereira, o maior exemplo de Mestre e Orientadora que tive em toda a minha vida. A senhora me ensinou a pesquisar e despertou em mim o desejo do perfeccionismo. Como é bom tê-la como referencial. A senhora foi quem deu vida e sentido ao mérito desta pesquisa.

Agradeço a minha coorientadora, Dra Leila, médica patologista, tão disponível durante toda a pesquisa, bem como à equipe do laboratório em Sobral, Ranielly e Eliomar.

Agradeço ainda a minha grande amiga, Thâmara Manuela Leila Carla da Cunha Silva Magalhães, que em todos os momentos foi muito mais que uma colega, foi uma verdadeira amiga, uma irmã com quem pude contar inúmeras vezes. Sem Thâmara esta pesquisa não teria sido realizada. Também imprescindíveis os colegas e amigos Filipe Nobre Chaves, Ealber Carvalho Macedo Luna, Paulo Goberlânio Barros Silva, Mariana Canuto Melo de Sousa Lopes e Adalberto do Nascimento Júnior, sempre prontos à ajudar e muito atenciosos.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Universidade Federal do Ceará – *campus* Sobral, na pessoa do diretor Prof. Dr. VICENTE DE PAULO TEIXEIRA PINTO.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do coordenador Prof. Dr. PAULO ROBERTO SANTOS.

À FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Santa Casa de Misericórdia de Sobral, na pessoa do diretor do Departamento de Pesquisa e Extensão, Prof. Dr. LUIS DERWAL SALLES JÚNIOR.

Ao Laboratório de Anatomopatologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. LEILA CARLA DA CUNHA SILVA MAGALHÃES.

Ao Curso de Odontologia e ao Laboratório de Patologia Bucal da FOE – *Campus* Fortaleza, na pessoa do seu coordenador, Prof. Dr. FABRÍCIO BITU SOUSA.

Aos professores participantes da banca examinadora, pelas valiosas colaborações e sugestões.

“Pode se alegrar e a Deus louvar, que já deu tudo certo.” (Padre Marcelo Rossi)

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO:** O Câncer de pele (não melanoma) é uma lesão com elevada prevalência, sendo o Carcinoma Basocelular (CBC) o tipo mais frequente dessa neoplasia maligna. Pesquisas recentes têm buscado biomarcadores moleculares para câncer, com enfoque no metabolismo energético das células, destacando-se o Fator Induzido por Hipóxia, HIF-1. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$  em CBC; correlacionar a imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  com tecido normal, subtipos histológicos e parâmetros clínicos de CBC. **METODOLOGIA:** A amostra foi constituída por 27 casos de CBC na região de cabeça e pescoço, classificados conforme subtipo histológico. Realizou-se a avaliação imuno-histoquímica pela técnica da Estreptoavidina-Biotina, com anticorpo HIF-1 $\alpha$  (clone EP1215Y, ABCAM<sup>®</sup>, diluição 1:100, recuperação antigênica com citrato pH6, Panela Pascal, Sistema Envision Flex, incubação *overnight*). Foram analisados cinco campos de cada caso no aumento de 400x, utilizando o programa Image J. Os testes estatísticos foram realizados com base nos níveis de significância de 5%, utilizando-se os testes de Mann-Whitney/Kruskall-Wallis. **RESULTADOS:** Obteve-se imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  em todos os casos de CBC, 100% (n=27), prevalecendo o subtipo nodular em idosos do sexo masculino e em face. Observaram-se imunomarcção citoplasmática fraca maior nas células das lesões em face (51,3 $\pm$ 20,3) (**p=0,018**) e ausência de imunomarcção citoplasmática nas células das lesões em não face (68,7 $\pm$ 22,6) (**p=0,015**). Houve maior imunomarcção nuclear forte em células de CBC comparativamente ao que foi observado nas células de pele normal (6,9 $\pm$ 7,4) (**p=0,036**); maior imunexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  nas células das lesões com margens comprometidas (61,1 $\pm$ 10,4) (**p=0,004**); maior percentual de células sem imunomarcção citoplasmática em lesões com margens livres (56,0 $\pm$ 23,2) (**p=0,004**); além de maior imunexpressão citoplasmática fraca em células de CBC com margens comprometidas, comparando-se às células de pele normal e margens livres (61,1 $\pm$ 10,4) (**p=0,042**). Não houve diferença estatística entre a imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  entre as células dos diversos subtipos, bem como entre células de lesões ulceradas e não ulceradas. **CONCLUSÃO:** Houve imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  em todos os casos de CBC da amostra analisada, sem diferença estatística quanto ao subtipo histológico, com menor imunomarcção em células de tecido epitelial normal. A imunexpressão do HIF-1 $\alpha$ , tanto nuclear quanto citoplasmática pode ser indicativo da participação dessa proteína nessas neoplasias, sugerindo possível papel do HIF-1 $\alpha$  nas carcinogênese do CBC.

**Palavras-chave:** Carcinoma Basocelular. Fator Induzido por Hipóxia. HIF-1. Hipóxia Celular.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Skin cancer (non-melanoma) is a lesion with high prevalence, with the Basal Cell Carcinoma (BCC) is the most common type of this malignancy. Recent research has sought molecular biomarkers for cancer, with a focus on energy metabolism of cells, highlighting the factor induced by hypoxia, HIF-1. To evaluate the immunohistochemical expression of HIF-1 $\alpha$  in CBC; correlate the immunoreactivity of HIF-1 $\alpha$  with normal tissue, histologic subtypes and clinical parameters of CBC. **METHODS:** The sample consisted of 27 cases of BCC in the head and neck region, classified as histologic subtype. Was performed immunohistochemical assessment by the technique of streptoavidin-Biotin with HIF-1 $\alpha$  antibody (clone EP1215Y, ABCAM®, 1: 100 dilution, antigen retrieval with citrate pH6, Pascal Pan, System Envision Flex, overnight incubation). five fields each case in 400x magnification were assessed, using the Image J program Statistical tests were performed based on significance level of 5% using the Mann-Whitney test / Kruskal-Wallis test. **RESULTS:** Obtained immunoreactivity of HIF-1 $\alpha$  in all cases of BCC, 100% (n = 27), whichever is the nodular subtype in males and elderly face. Observed was weak cytoplasmic immunostaining in cells of higher side lesions ( $51.3 \pm 20.3$ ) (p = 0.018) and no cytoplasmic immunostaining of cells in lesions in non-face ( $68.7 \pm 22.6$ ) (p = 0.015). Strong immunostaining was higher in nuclear BCC cells compared to that observed in normal skin cells ( $6.9 \pm 7.4$ ) (p = 0.036); greater immunoreactivity weak cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  in the lesions of the cells with positive margins ( $61.1 \pm 10.4$ ) (p = 0.004); higher percentage of cells with no cytoplasmic immunostaining in lesions with clear margins ( $56.0 \pm 23.2$ ) (p = 0.004); and greater weak cytoplasmic immunostaining in AML cells with positive margins compared to the normal skin cells and free margins ( $61.1 \pm 10.4$ ) (p = 0.042). There was no statistical difference between the immunostaining of HIF-1 $\alpha$  between cells of different subtypes and between cells ulcerated and non-ulcerated. **CONCLUSION:** There was immunoreactivity of HIF-1 $\alpha$  in all cases of CBC sample analyzed, with no statistical difference in the histological subtype, less immunostaining in normal epithelial tissue cells. The immunoreactivity of HIF-1 $\alpha$ , both as nuclear cytoplasmic may be indicative of the involvement of this protein in these tumors, suggesting a role of HIF-1 $\alpha$  in the CBC carcinogenesis.

**KEYWORDS:** Basal Cell Carcinoma. Factor Induced by Hypoxia. HIF-1. Hypoxia Mobile.

## ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Fotomicrografia exibindo imunoexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  em CBC sólido-cístico (400X)

.....  
37

**Figura 2:** Fotomicrografia evidenciando imunomarcção nuclear forte do HIF-1 $\alpha$  em CBC com componente escamoso (400X)..

.....  
38

**Figura 3:** Fotomicrografia mostrando imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em tecido epitelial normal (400X)

.....  
39

## TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Divisão de casos de CBC da amostra analisada. ....	34
<b>Tabela 2:</b> Caracterização clínica da amostra de CBC analisada.....	34
<b>Tabela 3:</b> Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$ em relação à localização da lesão de CBC .....	34
<b>Tabela 4:</b> Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$ em lesão CBC/Pele normal.....	35
<b>Tabela 5:</b> Avaliação da marcação imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$ nas Margens cirúrgicas de CBC da amostra. .....	35
<b>Tabela 6:</b> Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$ em margens de CBC x Pele Normal.....	35
<b>Tabela 7:</b> Marcação imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$ em CBC, avaliando-se a ulceração .....	36
<b>Tabela 8:</b> Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$ entre subtipos de CBC .....	36

## ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética  
CBC – Carcinoma Basocelular  
CEC – Carcinoma de Células Escamosas  
COX-2 – Cicloxigenase – 2  
CPM – Câncer de Pele Melanoma  
CPNM – Câncer de Pele Não Melanoma  
CRC – Carcinoma de Células Renais  
CXCR-4 – C-X-C Receptor de Quimiocina tipo 4  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
EPO - Eritropoietina  
HIF – Fator Induzido por Hipóxia  
HIF-1 $\alpha$  – Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
HPV – Papiloma Vírus Humano  
Ki67 – Antígeno Ki-67 – Proteína nuclear de proliferação celular  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PHD – Domínio Prolina Hidroxilase  
PUVA – Psoraleno associado a Radiação Ultravioleta tipo A  
PTEN – Homólogo da Fosfatase Tensina  
pVHL – Proteína de Von Hippel Lindau  
TA – Temperatura Ambiente  
UV – Radiação Ultravioleta  
UVA – Universidade Vale do Acaraú

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
1.1 FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA.....	15
1.2 OBJETIVO GERAL .....	17
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>ARTIGO</b> .....	<b>18</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	22
2.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	22
2.3 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	23
2.4 ANÁLISE DO PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO .....	23
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
2.6 IMPLICAÇÕES ÉTICAS.....	24
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS DO ARTIGO</b> .....	<b>31</b>
<b>APÊNDICE A – TABELAS</b> .....	<b>34</b>
<b>APÊNDICE B – FIGURAS</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXO B – CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS AND PREVENTION</b> <b>(CEBP): INSTRUCTIONS FOR AUTORS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Câncer de Pele Não Melanoma (CPNM) é o tumor maligno mais comum entre os seres humanos (REHMAN *et al.*, 2016). Conforme a revisão sistemática de Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2016, a incidência, morbidade e mortalidade de câncer de pele estão aumentando, apesar dos grandes avanços atuais. O número de casos novos de CPNM estimado para o Brasil, em 2016, soma 80.850 entre os homens e 94.910 quanto às mulheres (INCA, 2016).

O CPNM é encontrado em áreas do corpo expostas ao sol, especialmente nas regiões da cabeça e do pescoço (WERMKER *et al.*, 2015). Em relação ao acometimento, este câncer tem relação diretamente proporcional com a quantidade de radiação ultravioleta e inversamente proporcional ao grau de pigmentação da pele na população (MEDEIROS *et al.*, 2015).

Cânceres de pele são principalmente divididos em Melanoma (CPM) e CPNM, sendo este subdividido em Carcinoma Basocelular (CBC) e Carcinoma de Células Escamosas (CEC). O tipo CPM é responsável pela maior parte dos casos com mortalidade, ao passo que o CPNM é geralmente descrito como sendo indolente, porém, com características localmente agressivas que podem gerar sérios danos físicos e psicológicos aos pacientes afetados (SUÁREZ *et al.*, 2007, DEMIRSEREN *et al.*, 2014). CEC é derivado de queratinócitos da epiderme, tornando-o mais maligno que CBC, crescendo e espalhando-se mais rapidamente (YU e LI, 2015).

Quanto à classificação do CBC, Slater e Walsh – do Royal College of Pathologists (RCPs) – descreveram, em 2014, um conjunto de dados mínimos para a comunicação histopatológica de CBC compatível com as diretrizes da Associação Britânica de Dermatologia. Os padrões de crescimento descritos incluem os subtipos: Nodular; Superficial; Infiltrativo/Morfeico e Micronodular, juntamente com a presença de componente escamoso de malignidade (Carcinoma Basoescamoso). Foram observados, também, o acometimento de margens cirúrgicas e grau de profundidade da lesão.

A etiologia do câncer de pele é multifatorial. Apenas um agente ou fator causador isolado não pode ser claramente definido ou aceito, mas tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar associados. Narayanan *et al.* (2010) estudaram o papel das radiações ultravioletas como fator de risco na patogênese do câncer de pele e citaram outros fatores: estado de imunossupressão (uso de medicações imunossupressoras, transplantados e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida); síndromes genéticas (Xeroderma Pigmentoso, Albinismo Oculocutâneo, Epidermodisplasia Verruciforme, Síndrome do Nevo Basocelular); pessoas expostas a tratamentos clínicos dermatológicos (fototerapia e PUVA – terapia com psoraleno associado à radiação ultravioleta, UV, tipo A); portadores de alguns vírus (Papiloma

Vírus Humano – HPV, Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV); exposição a poluentes ambientais e carcinógenos químicos (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos); radiação ionizante, raios X, radiação artificial; indivíduos tabagistas, etilistas e idosos; pessoas leucodermas (com a pele clara, principalmente com olhos azuis, ou olhos castanho-claros, cabelos loiros e ruivos); presença de lesões precursoras (dermatoses, queratoses, cicatrizes crônicas); além de hábitos alimentares e trabalho sob exposição solar prolongada.

A radiação ultravioleta (UV) é o principal agente etiológico do câncer de pele, devido aos danos ao DNA e mutações genéticas, que, posteriormente, levam ao câncer de pele. O estudo de Apalla et al. (2016) descreveu que as alterações cutâneas relacionadas à radiação UV podem levar ao CBC cinco vezes mais frequentemente que ao CEC. O papel da radiação ultravioleta na alteração do material genético está bem definido no processo de carcinogênese (FELLER *et al.*, 2016, APALLA *et al.*, 2016).

### 1.1 FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA

O Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) é uma proteína heterodímera (fator de transcrição nuclear), dividida em 2 subunidades, alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ). Em condições de normóxia, após hidroxilação, os resíduos de HIF-1 ligam-se à proteína supressora de tumor Von Hippel Lindau (pVHL) e são rapidamente destruídos por ubiquitinação, degradadas por hidroxilação através dos domínios da prolina-hidroxilase (PHD) e, por fim, sofrem ubiquitinação via proteassomo (PEREIRA *et al.*, 2013).

Com o rápido crescimento tumoral e sua expansão, as regiões intratumorais podem apresentar-se em hipóxia, que é um estado caracterizado pela diminuição da tensão de oxigênio abaixo dos limites normais, e esta é normalmente observada em diversos tipos de câncer (RYU *et al.*, 2010). Todas as células do corpo necessitam de oxigênio para realizar suas funções metabólicas normais, incluindo a etapa de fosforilação oxidativa. A capacidade de células cancerígenas para se adaptar à hipóxia, quer transitória ou prolongada, é essencial para a sobrevivência do tumor (PÉREZ-SAYÁNS *et al.*, 2011, OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011).

A oxigenação em neoplasias sólidas depende do suprimento de oxigênio e do seu consumo pelas células tumorais. A hipóxia é um fenômeno comum em vários tipos de neoplasias malignas, contribuindo para a progressão do câncer e à seleção do fenótipo mais agressivo. Um importante mecanismo para a adaptação às concentrações de oxigênio reduzidas no microambiente tumoral é a regulação do HIF-1 (PEREIRA *et al.*, 2013).

O papel do HIF-1 $\alpha$  na carcinogênese é de sinalizar a mensagem de hipóxia para o núcleo

da célula, promovendo uma resposta ao estresse hipóxico. Esta resposta envolve o controle de mais de 100 genes associados com adaptação tumoral, tais como os genes que atuam na via glicolítica e nas alterações no microambiente tumoral, através da estabilização do pH e dos mecanismos de angiogênese. A hipóxia é uma marca característica da agressividade de tumores malignos, e a sinalização de HIF-1 $\alpha$  é regulada positivamente em muitos tumores (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011).

Tem sido demonstrado que a expressão do HIF-1 $\alpha$  tem um efeito significativo na progressão tumoral (PEREIRA et al., 2013). O estudo de Burrows et al. (2010) avaliaram a imunexpressão do Fator Indutor de Hipóxia (HIF) em carcinoma de tireoide. Eles confirmaram que o HIF-1 $\alpha$  é regulado pelas condições de hipóxia e que corresponde a um sinal oncogênico em muitos tumores sólidos. Avaliou-se, então, a regulação da expressão gênica de HIF-1 $\alpha$  em carcinomas primários de tireoide e suas linhagens celulares. O HIF-1 $\alpha$  não foi detectável em tecidos de indivíduos normais, mas foi expresso em carcinomas da tireoide. Tumores anaplásicos indiferenciados exibiam elevada expressão nuclear de HIF-1 $\alpha$ . Concluiu-se, neste estudo, que o HIF-1 é funcionalmente expresso em câncer de tireoide e está fortemente associado a um fenótipo de doença agressiva e resistência à terapêutica, o que pode ser considerado um alvo para tratamentos mais eficazes.

Anam *et al.* (2015) estudaram a correlação entre HIF-1 $\alpha$  e diversos cânceres. Através de uma metanálise, chegaram à conclusão de que o câncer de pulmão associa-se ao HIF-1 $\alpha$ , bem como o risco de câncer precoce, tanto em população caucasiana como asiática. Pode, assim, o HIF-1 $\alpha$  ser um marcador prognóstico para o câncer, mas fatores biológicos envolvidos na progressão tumoral, como marcadores tumorais, não são completamente compreendidos.

O presente estudo surge frente à necessidade de demonstrar a importância de marcadores tumorais no processo da carcinogênese humana, particularmente em CBC. Análises imunohistoquímicas são úteis para determinar se ocorre ou não aumento da produção de HIF-1 $\alpha$  nos casos de CBC. Atualmente, raros estudos neste sentido foram realizados. Os resultados obtidos podem colaborar para um melhor entendimento de como ocorre a formação e o crescimento dessas entidades patológicas, podendo futuramente contribuir para o desenvolvimento de novas formas de tratamento.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

O propósito deste estudo foi analisar a imunexpressão do fator induzido por hipóxia (HIF) em casos de Carcinoma Basocelular

### 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a imunexpressão do HIF-1 em Carcinomas Basocelular através da técnica de imuno-histoquímica;

Comparar a expressão imuno-histoquímica do HIF-1 em células de CBC com células de tecido epitelial normal.

Correlacionar a imunexpressão do HIF-1 com os subtipos histológicos dos casos de Carcinoma Basocelular;

Correlacionar a imunexpressão do HIF-1 com os parâmetros clínicos dos casos de Carcinoma Basocelular;

## ARTIGO

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), sendo aprovado sob o CAAE: 48759915.4.0000.5053 (**Anexo A**).

Diante da aprovação do CEP, a dissertação de mestrado é composta por um capítulo que contém um artigo científico, que será submetido à publicação no periódico “Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (CEBP)” (Qualis Capes 1), (**Anexo B**), conforme descrito abaixo:

***IMMUNOEXPRESSION OF INDUCED BY HYPOXIA FACTOR (HIF-1) IN BASAL CELL CARCINOMA.***

**IMUNOEXPRESSION DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF-1) EM  
CARCINOMA BASOCELULAR**

***IMMUNOEXPRESSION OF INDUCED BY HYPOXIA FACTOR (HIF-1) IN BASAL  
CELL CARCINOMA.***

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (CEBP)** (Print ISSN: 1055-9965; Online ISSN 1538-7755).

**Autores:**

Catarina Maria de Sena

Thamara Manoela Marinho Bezerra

Leila Carla Da Cunha Silva Magalhães

Paulo Roberto Santos

Vicente de Paulo Teixeira Pinto

Karuza Maria Alves Pereira (Autor correspondente)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O Câncer de pele (não melanoma) é uma lesão com elevada prevalência, sendo o Carcinoma Basocelular (CBC) o tipo mais frequente dessa neoplasia maligna. Pesquisas recentes têm buscado biomarcadores moleculares para câncer, com enfoque no metabolismo energético das células, destacando-se o Fator Induzido por Hipóxia, HIF-1. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$  em CBC; correlacionar a imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  com tecido normal, subtipos histológicos e parâmetros clínicos de CBC. **METODOLOGIA:** A amostra foi constituída por 27 casos de CBC na região de cabeça e pescoço, classificados conforme subtipo histológico. Realizou-se a avaliação imuno-histoquímica pela técnica da Estreptoavidina-Biotina, com anticorpo HIF-1 $\alpha$  (clone EP1215Y, ABCAM<sup>®</sup>, diluição 1:100, Citrato pH6, Pascal, Sistema Envision Flex, *overnight*). Foram analisados cinco campos de cada caso no aumento de 400x, utilizando o programa Image J. Os testes estatísticos foram realizados com base nos níveis de significância de 5%, utilizando-se os testes de Mann-Whitney/Kruskall-Wallis. **RESULTADOS:** Obteve-se imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  em todos os casos de CBC, 100% (n=27), prevalecendo o subtipo nodular em idosos do sexo masculino e em face. Observaram-se imunomarcção citoplasmática fraca maior nas células das lesões em face (51,3 $\pm$ 20,3) (**p=0,018**) e ausência de imunomarcção citoplasmática nas células das lesões em não face (68,7 $\pm$ 22,6) (**p=0,015**). Houve maior imunomarcção nuclear forte em células de CBC comparativamente ao que foi observado nas células de pele normal (6,9 $\pm$ 7,4) (**p=0,036**); maior imunexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  nas células das lesões com margens comprometidas (61,1 $\pm$ 10,4) (**p=0,004**); maior percentual de células sem imunomarcção citoplasmática em lesões com margens livres (56,0 $\pm$ 23,2) (**p=0,004**); além de maior imunexpressão citoplasmática fraca em células de CBC com margens comprometidas, comparando-se às células de pele normal e margens livres (61,1 $\pm$ 10,4) (**p=0,042**). Não houve diferença estatística entre a imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  entre as células dos diversos subtipos, bem como entre células de lesões ulceradas e não ulceradas. **CONCLUSÃO:** Houve imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  em todos os casos de CBC da amostra analisada, sem diferença estatística quanto ao subtipo histológico, com menor imunomarcção em células de tecido epitelial normal. A imunexpressão do HIF-1 $\alpha$ , tanto nuclear quanto citoplasmática pode ser indicativo da participação dessa proteína nessas neoplasias, sugerindo possível papel do HIF-1 $\alpha$  na carcinogênese do CBC.

**Palavras-chave:** Carcinoma Basocelular. Fator Induzido por Hipóxia-1. HIF-1. Hipóxia Celular.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele não melanoma (CPNM) é a neoplasia maligna mais frequente em populações de pele clara em muitas partes do mundo, sendo o Carcinoma Basocelular (CBC) o tipo mais comum deste câncer (1, 2). A incidência, morbidade e mortalidade de câncer de pele estão aumentando, apesar dos grandes avanços atuais (3). Segundo o INCA (4) na previsão para 2016, o número de casos novos de CPNM estimado para o Brasil, em 2016, é de 80.850 entre homens e de 94.910 entre as mulheres.

O CPNM é normalmente encontrado em áreas do corpo expostas ao sol, especialmente nas regiões da cabeça e do pescoço (5). Este câncer tem relação diretamente proporcional à quantidade de exposição à radiação ultravioleta (UV) e inversamente proporcional ao grau de pigmentação da pele no indivíduo (6). O CBC geralmente possui crescimento indolente, com características clínicas, como tamanho do tumor e presença de ulceração (7).

Tumores sólidos possuem uma particularidade importante de crescimento mesmo em ambiente de hipóxia, isto é, com reduzida disponibilidade de oxigênio. A capacidade de células cancerígenas para se adaptarem à hipóxia prolongada ou transitória é essencial para a sobrevivência do tumor (8, 9). As baixas concentrações de oxigênio estimulam cascatas de vias moleculares, resultando em angiogênese, glicólise e mudanças no ciclo celular. Nessas condições, uma via de sinalização que envolve um regulador de resposta a oxigênio, chamado de Fator Induzido por Hipóxia (HIF), é ativada. Um importante mecanismo para adaptação às baixas concentrações de oxigênio é a expressão e ativação do HIF-1. (10, 11).

O Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) é um fator transcricional com importante função na resposta adaptativa das células ao ambiente de hipóxia (12). Quando ativado, o HIF-1 se desloca para o núcleo celular, induzindo a transcrição de vários genes como resposta para evitar a morte celular pela hipóxia tumoral. (13). A expressão de HIF-1 $\alpha$  pode, portanto, fornecer informações valiosas para avaliar o prognóstico tumoral (10).

Diante da escassez de estudos que evidenciem o papel do HIF-1 na biologia tumoral em neoplasias de pele, o presente estudo busca analisar a participação do HIF-1 $\alpha$  em CBC, suas variantes clínicas e subtipos histopatológicos, além de comparar com o tecido epitelial normal, visando a contribuir para o melhor entendimento deste câncer de pele.

## 2 METODOLOGIA

A pesquisa foi do tipo descritiva, transversal e intencional por intermédio de estudos morfológico e imuno-histoquímico (imunexpressão do fator induzido por hipóxia- HIF-1 $\alpha$ ) de casos de CBC.

### 2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população alvo foi integrada por todos os casos de lesões primárias de CBC em face e em não face (orelha e pescoço) do banco de dados de diagnósticos histopatológicos do Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, durante o período compreendido entre outubro de 2013 a outubro de 2014.

Realizou-se um cálculo estatístico com base em estudo prévio que observou 36 casos de carcinoma espinocelular (14). Observou-se a imunomarcagem positiva para HIF-1 $\alpha$ : sendo 54% destes casos positivos para angiogenina, um fator angiogênico, e 18% negativos ( $p=0,031$ ). Estimou-se que, em nossa pesquisa com 71 blocos de CBC, seria necessário avaliar um total de 27 casos, a fim de obter uma amostra com 80% de poder e 95% de significância para o comportamento biológico do HIF-1 $\alpha$  em uma amostra de CBC pelo método de Fleiss.

O número de casos da amostra foi classificado conforme subtipos histológicos, sendo CBC escamoso  $n=5$  (18,5%), infiltrativo  $n=3$  (11,1%), nodular  $n=8$  (29,6%), sólido  $n=7$  (25,9%), sólido-cístico  $n=4$  (14,8%) (**Tabela 1**).

### 2.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo os casos de espécimes da biópsia com quantidade suficiente de material disponível nos blocos de parafina para análise imuno-histoquímica e com descrição completa do subtipo clínico de CBC.

Os casos selecionados apresentaram laudo histopatológico devidamente preenchido para anotação de dados de interesse sobre número do prontuário, data de entrada no setor, data do resultado, sexo do paciente, idade, local da lesão, tipo de material, dados macroscópicos (aspecto, dimensões, número de blocos de parafina) e dados microscópicos (nível anatômico, acometimento de margens cirúrgicas, invasão perineural, presença de ulceração e de componente escamoso de malignidade).

Foram excluídos, da amostra, os casos com quantidade insuficiente de material

emblocado em parafina, tanto para estudo morfológico como para análise imuno-histoquímica, bem como os casos que apresentaram os seus respectivos laudos incompletos.

### 2.3 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Secções de tecidos cortados a 3µm de espessura, fixados em formalina e embebidos em parafina foram montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3- aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA). Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica pela técnica da Estreptoavidina-Biotina (Labeled StreptAvidin Biotin – LSAB). Esta técnica consistiu resumidamente nos seguintes passos: passagem por três banhos em xilol, durante dez minutos cada. Imersão em três passagens de álcool absoluto durante 5 minutos. Lavagem em água corrente e, logo após, uma passagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com citrato pH 6.0, por 30 minutos a 99°C, na panela Pascal. Bloqueio da peroxidase foi com peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos, à Temperatura Ambiente (TA). Em seguida, realizou-se a incubação com o anticorpo monoclonal anti HIF-1 alpha (clone EP1215Y, ABCAM®, Cambridge, MA, USA), *overnight*, na diluição de 1:200, e, posteriormente, lavadas com solução de tampão fosfato-salino, PBS (*phosphate buffered saline*).

As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário Sistema Envision Flex (DAKO®, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos à TA. Em seguida, foi feita a incubação em solução cromógena preparada com DAB, durante 10 minutos em câmara escura (DAKO®, Carpinteria, CA, USA). Posteriormente, os espécimes foram lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contracoloração foi realizada com hematoxilina e depois foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol. Como controle positivo, utilizou-se Adenocarcinoma de Mama, ao passo que o controle negativo foi obtido excluindo-se a aplicação do anticorpo primário.

### 2.4 ANÁLISE DO PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO

Após a realização da fase laboratorial, as lâminas de cada espécime foram analisadas sob microscopia de luz. O examinador não teve acesso aos dados clínicos (subtipo histológico) da lesão analisada. Sob o aumento de 400x foram selecionados cinco campos aleatoriamente e cada um desses campos foi fotomicrografado com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio (Leica Microsystems). As imagens obtidas foram transferidas para um computador

e do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ®, versão 1.4.3.67, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Em cada um dos cinco campos fotomicrografado, foi realizada a contagem de todas as células imunomarcadas. Considerou-se como imunomarcação para o HIF-1 $\alpha$  as células que exibiram coloração nuclear ou citoplasmática acastanhada, independente da intensidade de imunomarcação (adaptado de 15). Para cada caso, foi estabelecida uma média de células imunopositivas para posterior comparação.

Na avaliação qualitativa da imunomarcação para o HIF-1 $\alpha$ , a intensidade da imunomarcação foi descrita e dividida em: núcleos fortemente imunomarcados, núcleos fracamente imunomarcados, ausência de imunomarcação nuclear; citoplasmas com imunomarcação para o HIF-1 $\alpha$  forte, moderada, fraca e ausência de imunoexpressão, (adaptado de 15).

O procedimento de contagem foi realizado por um único observador previamente calibrado para reconhecimentos dos padrões de imunomarcação nuclear, forte, fraco e ausente; e citoplasmático forte, moderado, fraco ou ausente.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a análise quantitativa, os dados coletados foram submetidos à análise estatística, a fim de testar as hipóteses levantadas e foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0, no qual as análises foram realizadas considerando uma confiança de 95%.

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e os dados quantitativos em forma de média e desvio-padrão. A comparação entre grupos do percentual de células exibindo os diferentes padrões de imunomarcação foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos, teste de Kolmogorov-Smirnov).

## 2.6 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

Após a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), esta pesquisa foi aprovada, sob o CAAE: 48759915.4.0000.5053.

### 3 RESULTADOS

Um total de 27 casos de CBC foi obtido neste estudo. O subtipo histológico nodular foi notificado como a maioria dos casos, sendo 8 casos deste subtipo (29,3%), seguido por 7 casos de CBC sólido (25,9%), 5 escamoso (18,5%), 4 sólido-cístico (14,8%) e 3 infiltrativo (11,1%) (Tabela 1). Dentre todos os casos, 18 casos acometeram pacientes do sexo feminino (66,7%) e 9 casos acometeram indivíduos do sexo masculino (33,3%). A média de idade foi 69,5 ( $\pm 16,5$  anos), sendo 13 casos (48,1%) em pacientes com até 70 anos e 14 casos em pacientes com mais de 70 anos (51,9%). O local de acometimento mais comum foi em face,  $n=21$  (77,8%), e em não face,  $n=6$  (22,2%) (Tabela 2).

Quanto à imunomarcção do HIF-1 $\alpha$ , todos os casos da amostra analisada,  $n=27$  (100%) exibiram imunexpressão do HIF-1 $\alpha$ , independentemente da localização nuclear ou citoplasmática. Analisando a imunexpressão da proteína HIF-1 $\alpha$  em face e em não face, observa-se que a imunomarcção citoplasmática fraca (Figura 1) foi maior nas células das lesões em face ( $51,3 \pm 20,3$ ) quando comparadas às das lesões não face ( $28,7 \pm 22,1$ ), com diferença estatística significativa ( $p=0.018$ ). Ademais, houve maior percentual de células sem imunomarcção citoplasmática nas lesões não face ( $68,7 \pm 22,6$ ), em relação às lesões em face ( $46,4 \pm 20,2$ ), com diferença significativa ( $p=0.015$ ) (Tabela 3).

Comparando-se a marcação imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$  em CBC com margens livres às células de pele normal, verificou-se que a imunomarcção nuclear forte (veja a Figura 2) do HIF-1 $\alpha$  em células tumorais ( $6,9 \pm 7,4$ ) foi maior em relação às células de pele não lesional (Figura 3) ( $2,7 \pm 1,2$ ), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0.036$ ) (Tabela 4).

Avaliando-se o comprometimento de margens cirúrgicas, 20 amostras (74,1%) apresentavam margens livres, ao passo que 7 amostras (25,9%), margens comprometidas. Verificou-se um maior número de células com imunexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  nas células das lesões com margens comprometidas ( $61,1 \pm 10,4$ ), quando comparadas às das lesões com margens livres ( $41,6 \pm 23,4$ ) ( $p=0.004$ ), além de maior percentual de células que não expressavam HIF-1 $\alpha$  no citoplasma para as lesões com margens livres ( $56,0 \pm 23,2$ ) ( $p=0.004$ ) (Tabela 5).

Adicionalmente, comparando-se imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  em células de pele normal, de CBC com margens livres e de CBC com margens comprometidas, observou-se maior

imunoeexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  em células de CBC com margens comprometidas (61,1 $\pm$ 10,4) (p=0,042) (Tabela 6).

Quanto à presença de ulceração nas lesões de CBC, não se evidenciou diferença estatística na imunoeexpressão nuclear em células das lesões ulceradas comparadas às das lesões sem ulceração, tanto imunoeexpressão fraca (p=0,195), quanto imunomarcção forte (p=0,716) e ausência de imunomarcção (p=0,195). Também não houve diferença estatística na imunomarcção citoplasmática para o HIF-1 $\alpha$  nas células das lesões ulceradas comparadas às das lesões sem ulceração: imunomarcção forte (p=0,865), imunomarcção moderada (p=0,368), fraca (p=0,422) e ausente (p=0,318) (Tabela 7).

Avaliando-se a imunoeexpressão citoplasmática do HIF-1 $\alpha$  entre as células dos diversos subtipos de CBC, não houve diferença estatística entre o percentual de células imunomarcadas: imunomarcção forte (0,1 a 0,5; p=0,698), imunomarcção moderada (0,8 a 3,4, p=0,298), imunomarcção fraca (30,9 a 55,1; p=0,171) ou ausência de imunomarcção (42,5 a 65,5; p=0,188). Da mesma forma, avaliando-se imunomarcção nuclear, também não houve diferença estatística entre o percentual de células imunomarcadas entre os subtipos: imunomarcção forte (3,9 a 11,5; p=0,753), imunomarcção fraca (48,7 a 81,3; p=0,254) ou ausência de imunomarcção (14,8 a 39,8; p=0,476) (Tabela 8).

#### 4 DISCUSSÃO

O Câncer de Pele Não Melanoma é uma lesão com elevada prevalência, sendo o CBC o tipo mais frequente dessa neoplasia maligna, acometendo principalmente pessoas leucodermas (16,17). A carcinogênese é um processo complexo e várias proteínas relacionadas a este processo têm sido estudadas no CBC. Porém, até então, não há estudos descritos na literatura do HIF nestas lesões (18,10). O HIF é uma proteína heterodímera composta por duas subunidades, HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  (expressa constitutivamente), sendo aquela ativada em meio à hipóxia celular. (19).

A presente pesquisa avaliou quantitativa e qualitativamente a imunoeexpressão da proteína HIF-1 $\alpha$  em células de CBC, correlacionando com parâmetros clínicos dos pacientes portadores da lesão. Os dados clínicos deste estudo mostraram predominância no sexo feminino, n=18 (66,7%), em idosos (69,5 $\pm$ 16,5 anos), acometendo principalmente a face, n=21 (77,8%) (Tabela 2). Quanto ao sexo, estudos sugerem que o CBC é mais prevalente no sexo masculino, diferente desta pesquisa. Quanto à idade e à localização, observou-se maior incidência em idosos e em face, corroborando aos autores com resultados semelhantes (20, 21,

22).

Com relação ao subtipo de crescimento do CBC, o mais frequente nesta pesquisa foi o nodular,  $n= 8$  (29,6 %), concordando com outros estudos (20, 21, 22) (Tabela 1). Este dado pode ser justificado pelo aspecto visual do subtipo nodular, apresentando-se clinicamente com aumento de volume, formato arredondado, bordos definidos, aspecto peroláceo, com telangiectasias exofíticas, o que facilita a visualização e a identificação, propiciando assim o diagnóstico e aumento da incidência (23, 24).

A análise imuno-histoquímica do presente estudo demonstrou que todos os casos analisados de CBC apresentaram imunomarcção positiva para HIF-1 $\alpha$  ( $n=27$ , 100% da amostra). Vasconcelos et al (2015) analisaram 57 casos de CEC oral e evidenciaram células imunopositivas para HIF-1 $\alpha$ , confirmando imunomarcção positiva de HIF-1 $\alpha$  em 100% dos casos (15). Outro estudo observou em 70% dos casos imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  de carcinoma de pulmão não pequenas células (25). Esses resultados sugerem que o HIF-1 $\alpha$  pode ser um imunomarcador útil para alguns cânceres, inclusive CBC.

Analisando a imunexpressão de HIF-1 $\alpha$  em neoplasias malignas, 216 pacientes portadores de CRC apresentaram imunomarcção positiva por HIF-1 $\alpha$ , principalmente no citoplasma (26). Em nosso estudo, analisando o padrão de imunomarcção citoplasmática de HIF-1 $\alpha$  versus localização da lesão, observamos maior número de células com imunomarcção citoplasmática fraca em lesões em face ( $51,3\pm 20,3$ ) quando comparadas à imunomarcção em células de lesões não face ( $28,7\pm 22,1$ ),  $p=0.018$  (Tabela 3). Além disso, nas lesões em não face, houve maior percentual das células sem imunomarcção citoplasmática ( $68,7\pm 22,6$ ),  $p=0.015$  (Tabela 3). A elevada imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  nas lesões em face pode sugerir maior agressividade dessas lesões. Tal fato pode ser associado à maior exposição deste local à radiação ultravioleta, o principal fator de risco no desenvolvimento do CBC (24, 27). Outro estudo, também com CBC, porém com o marcador tumoral COX-2 e CXCR-4, verificaram maior agressividade tumoral induzida por radiações UV (28).

Em uma revisão sistemática e metanálise entre estudos de expressão de HIF-1 $\alpha$  em Carcinoma de Células Renais, encontraram-se 4 estudos de expressão nuclear de HIF-1 $\alpha$  (29). Analisando a imunexpressão nuclear de HIF-1 $\alpha$  nesta pesquisa, observamos que as lesões de CBC exibiram maior percentual de células com forte imunomarcção nuclear para HIF-1 $\alpha$  ( $6,9\pm 7,4$ ), comparado às células de pele normal com forte imunomarcção nuclear ( $2,7\pm 1,2$ ), sendo  $p=0.036$  (Tabela 4). Este resultado condiz com o fato de que o HIF-1 $\alpha$  é ativado em meio de hipóxia tumoral, desloca-se para o núcleo celular, propiciando a sobrevivência celular em meio adverso, podendo assim estar envolvido na carcinogênese (10, 18).

Quanto ao acometimento de margens cirúrgicas, houve maior percentual de células com imunomarcção citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  em lesões de CBC com margens comprometidas (61,1 $\pm$ 10,4),  $p=0.004$  e maior percentual de células sem imunomarcção citoplasmática nas lesões CBC com margens livres (56,0 $\pm$ 23,2),  $p=0.004$  (Tabela 5). Quanto às variáveis imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em células de CBC com margens livres, células de CBC com margens comprometidas e células de pele normal, observa-se que é maior o percentual de células tumorais imunomarcadas nas lesões com margens comprometidas (61,1 $\pm$ 10,4), com diferença estatística ( $p=0,042$ ) (Tabela 6). As regiões tumorais de margens comprometidas devem possuir células com capacidade de crescer em microambiente de hipóxia, assim, podem ativar o HIF-1 $\alpha$ , favorecendo a imunoexpressão desta proteína em tais células.

A pesquisa com o marcador tumoral COX-2 em CBC concluiu uma relação direta entre a profundidade de invasão tumoral, acometimento de margens e a elevada expressão de tal marcador (28). Isto sugere que a presença de margens histologicamente comprometidas pelas células malignas favorece a imunoexpressão de marcadores tumorais, propiciando pior prognóstico. Ademais, o maior percentual de células nas lesões CBC com margens livres sem imunomarcção citoplasmática pode indicar que embora do ponto de vista cirúrgico as lesões sejam consideradas com margens livres, podem ainda apresentar indícios de células neoplásicas nas suas margens, podendo recidivar e/ou interferir no prognóstico da lesão.

Quanto à presença de ulceração, não houve diferença estatística entre a imunoexpressão nuclear do HIF-1 $\alpha$  em células de lesões CBC ulceradas e não ulceradas, tanto forte quanto fraca; logo, não se pode associar a imunoexpressão para o HIF-1 $\alpha$  com a presença de ulceração nas lesões de CBC analisadas (Tabela 7). Outro estudo (20) avaliando a imunoexpressão de Ki67 como marcador biológico de CBC, também não encontrou associação estatística entre CBC e presença de ulceração.

Avaliando-se os diversos subtipos histológicos de CBC, observamos que a presença de um determinado subtipo parece não influenciar na imunoexpressão para o HIF-1 $\alpha$ . Não se evidenciou diferença estatística na presente pesquisa com relação a variável subtipo histológico, contudo, é válido ressaltar que o subtipo infiltrativo destacou-se por grande percentual de células com imunoexpressão nuclear fraca pelo HIF-1 $\alpha$  (81,3 $\pm$ 10,4),  $p=0,254$  (Tabela 8). Este resultado difere da pesquisa (28) que avaliou a imunoexpressão do CXCR-4 em 38 casos de CBC, no qual encontrou uma significativa expressão de tal marcador, especialmente no subtipo infiltrativo do CBC. Esse fato pode decorrer provavelmente pela via de ativação diferente entre esses marcadores.

Houve também destaque para o padrão de crescimento com componente escamoso, com elevado percentual de células com imunomarcção nuclear forte pelo HIF-1 $\alpha$  (11,5 $\pm$ 13,0), contudo, sem significância estatística,  $p=0.753$  (Tabela 8). A presença do componente escamoso na lesão CBC (histologicamente semelhante ao CEC) poderia apresentar maior agressividade, contudo nesta pesquisa, a imunexpressão do HIF-1 $\alpha$  parece não estar relacionada à diferenciação celular (5, 30, 31).

Apesar da escassez de trabalhos envolvendo HIF-1 $\alpha$  e o CBC, o presente estudo observou a imunexpressão desta proteína nos CBC, analisados além da diferença importante na imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  nas lesões CBC comparadas ao tecido epitelial normal, sugerindo que o Fator Induzido por Hipóxia pode estar envolvido na carcinogênese do CBC. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar a real participação do marcador no Carcinoma Basocelular.

## **5 CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que houve expressão imuno-histoquímica da proteína HIF-1 $\alpha$  em células de todas as lesões de CBC analisadas, independentemente de parâmetros clínicos e/ou subtipos histológicos; além de maior imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  nas células de CBC que nas células de tecido epitelial normal. Os dados obtidos na presente pesquisa futuramente podem embasar uma possível participação de HIF-1 $\alpha$  como marcador de lesões CBC, auxiliando o diagnóstico precoce, acompanhamento e tratamento adequados. É coerente destacar que ainda são necessários mais estudos para elucidar a real participação do HIF-1 $\alpha$  em CBC.

## **COLABORADORES**

Leila Carla da Cunha Silva Magalhães,

Thâmara Manoela Marinho Bezerra,

Filipe Nobre Chaves,

Ealber Carvalho Macedo Luna,

Paulo Goberlânio Barros Silva,

Mariana Canuto Melo de Sousa Lopes,

Adalberto do Nascimento Júnior participaram no suporte técnico nas fases laboratoriais da pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS DO ARTIGO

1. Videnović G, Miljuš D, Ilić D, Krasić D, Živković S. Nonmelanoma Skin Cancer in the Population of the City of Belgrade in the Period 1999-2011. *Srp Arh Celok Lek.* 2015; Jun;143(5-6):290–5.
2. Lahmann PH, Hughes MCB, Williams GM, Green AC. A prospective study of measured body size, height, and risk of keratinocyte cancers and melanoma. *Cancer Epidemiol.* 2016 Feb;40:119–25.
3. Tejera-Vaquero A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016 Feb 3.
4. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp> (Acesso em março/2016).
5. Wermker K, Roknic N, Goessling K, Klein M, Schulze H-J, Hallermann C. Basosquamous carcinoma of the head and neck: clinical and histologic characteristics and their impact on disease progression. *Neoplasia.* 2015 Mar;17(3):301-5.
6. Medeiros PM, Alves NR de M, Silva CC da, Faria PCP de, Barcaui CB, Piñeiro-Maceira J. Collision of malignant neoplasms of the skin: basosquamous cell carcinoma associated with melanoma. *An Bras Dermatol.* 2015 Jun;90(3 Suppl 1):39-42.
7. Lallas A, Apalla Z, Ioannides D, Argenziano G, Castagnetti F, Moscarella E, et al. Dermoscopy in the diagnosis and management of basal cell carcinoma. *Future Oncol.* 2015 Nov;11(22):2975-84.
8. Sandulache VC, Myers JN. Altered metabolism in head and neck squamous cell carcinoma: an opportunity for identification of novel biomarkers and drug targets. *Head Neck.* 2012 Feb;34(2):282-90.
9. Pereira KMA, Chaves FN, Viana TSA, Carvalho FSR, Costa FWG, Alves APNN, et al. Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). *Oncol Lett.* 2013 Aug; 6(2):311-6.
10. Zheng Y, Ni Y, Huang X, Wang Z, Han W. Overexpression of HIF-1 $\alpha$  indicates a poor prognosis in tongue carcinoma and may be associated with tumour metastasis. *Oncol Lett.* 2013 Apr;5(4):1285-9.
11. Wan J, Che Y, Kang N; Wu W. SOCS3 blocks HIF-1 $\alpha$  expression to inhibit proliferation and angiogenesis of human small cell lung cancer by downregulating activation of Akt, but not STAT3. *Mol Med Rep.* 2015 Jul;12(1):83-92.
12. Zhao Q, Li Y, Tan B-B, Fan L-Q, Yang P-G, Tian Y. HIF-1 $\alpha$  Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27a. *PLoS ONE.* 2015;10(8):e0132746.

13. Santos M, Mercante AM da C, Louro ID, Gonçalves AJ, de Carvalho MB, da Silva EHT, et al. HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *PLoS ONE*. 2012; 7(9):e45228.
14. Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Hu GF, et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2012 Nov; 48(11):1120-7.
15. Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Pereira de Oliveira DH, de Moura Santos E, Pinto LP, da Silveira EJ, et al. Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;73(9):1753-60.
16. Brewer JD, Shanafelt TD, Khezri F, Sosa Seda IM, Zubair AS, Baum CL, et al. Increased incidence and recurrence rates of nonmelanoma skin cancer in patients with non-Hodgkin lymphoma: a Rochester Epidemiology Project population-based study in Minnesota. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Feb;72(2):302-9.
17. Feller L, Khammissa RA, Kramer B, Altini M, Lemmer J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Head Face Med*. 2016 Feb 5;12(1):11.
18. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006 Aug;93(8):E73-80.
19. Chen CS, Zhao Q, Qian S, Li HL, Guo CY, Zhang W, et al. Ultrasound-guided RNA interference targeting HIF-1 alpha improves the effects of transarterialchemoembolization in rat liver tumors. *Onco Targets Ther*. 2015 Nov 27;8:3539-48.
20. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J*. 2014 Apr;16(4):229-32.
21. Ghanadan A, Abdollahi P, Rabet M, Naraghi Z, Abbasi MA, Moslehi H, et al. Different Anatomical Distribution of Basal Cell Carcinoma Subtypes in Iranian Population: Association between Site and Subtype. *Ann Dermatol*. 2014 Oct;26(5):559-63. doi: 10.5021/ad.2014.26.5.559. Epub 2014 Sep 26.
22. Demirseren DD, Ceran C, Aksam B, Demirseren ME, Metin A. Basal cell carcinoma of the head and neck region: a retrospective analysis of completely excised 331 cases. *J Skin Cancer*. 2014;2014:858636.
23. Slater D, Walsh M. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for the histological reporting of primary cutaneous basal cell carcinoma. The Royal College of Pathologists (RCP). May 2014. England and Wales, n. 261035. G123, v3.
24. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med*. 2015 Jun 1;88(2):167-79.

25. He LY, Li L, Guo ML, Zhang Y, Zhang HZ. Relationship between CD4+CD25+ Treg and expression of HIF-1 $\alpha$  and Ki-67 in NSCLC patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Apr;19(8):1351-5.
26. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Ljungberg B. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Expression in Renal Cell Carcinoma Analyzed by Tissue Microarray. *Eur Urol*. 2006 Dec;50(6):1272-7.
27. Basile J, Thiers B, Maize J Sr, Lathers DM. Chemokine receptor expression in non-melanoma skin cancer *J Cutan Pathol*. 2008 Jul;35(7):623-9.
28. Sivrikoz ON, Uyar B, Dağ F, Taşlı F, Sanal SM. CXCR-4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin; their relationship with tumor invasiveness and histological subtype. *Turk Patoloji Derg*. 2015;31(1):30-5.
29. Fan Y, Li H, Ma X, Gao Y, Chen L, Li X, et al. Prognostic Significance of Hypoxia-Inducible Factor Expression in Renal Cell Carcinoma: A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(38):e1646.
30. Apalla Z, Calzavara-Pinton P, Lallas A, Argenziano G, Kyrgidis A, Crotti S, et al. Histopathological study of perilesional skin in patients diagnosed with nonmelanoma skin cancer. *Clin Exp Dermatol*. 2016 Jan;41(1):21-5.
31. Yu X, Li Z. The role of miRNAs in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2016 Jan;20(1):3-9.

## APÊNDICE A – TABELAS

**Tabela 1:** Divisão de casos de CBC da amostra analisada.

	<b>n (amostra)</b>	<b>Percentual de células %</b>
<b>Casuística</b>	27	100.0
<b>Subtipo</b>		
Escamoso	5	18.5
Infiltrativo	3	11.1
Nodular	8	29.6
Sólido	7	25.9
Sólido-Cístico	4	14.8

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

**Tabela 2:** Caracterização clínica da amostra de CBC analisada.

<b>Casuística</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Feminino	18	66.7
Masculino	9	33.3
<b>Idade</b> (Média = 69.5±16.5)		
Até 70 anos	13	48.1
Mais de 70 anos	14	51.9
<b>Localização</b>		
Face	21	77.8
Não face	6	22.2
<b>Margens</b>		
Livres	20	74.1
Comprometidas	7	25.9
<b>Ulceração</b>		
Não	16	59.2
Sim	11	40.8

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

**Tabela 3:** Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em relação à localização da lesão.

	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Percentual de células</b>						
			<b>Núcleo</b>			<b>Citoplasma</b>			
			<b>Forte</b>	<b>Fraco</b>	<b>Ausente</b>	<b>Forte</b>	<b>Moderado</b>	<b>Fraco</b>	<b>Ausente</b>
<b>Localização</b>									
Face	21	77.8	5.7±3.4	69.1±13.3	25.1±12.3	0.2±0.4	2.2±2.1	51.3±20.3*	46.4±20.2
Não face**	6	22.2	9.9±1.9	49.4±28.7	40.7±33.1	0.1±0.2	2.6±1.7	28.7±22.1	68.7±22.6*
<b>p-Valor<sup>a</sup></b>			0.550	0.157	0.476	0.670	0.712	<b>0.018</b>	<b>0.015</b>

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste de Mann-Whitney;

\*p<0.05. Dados expressos em forma de média ± desvio-padrão;

\*\*Não Face: Orelha e pescoço.

**Tabela 4:** Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em lesão CBC/Pele normal da amostra analisada.

	n %		Percentual de células						
			Núcleo			Citoplasma			
			Forte	Fraco	Ausente	Forte	Moderado	Fraco	Ausente
<b>Casuística</b>	27	100.0	8.0 $\pm$ 8.9	63.5 $\pm$ 20.3	28.6 $\pm$ 21.3	0.2 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 2.2	49.8 $\pm$ 23.6	47.4 $\pm$ 23.7
Lesão CBC (margem livre)	20	77.8	6.9 $\pm$ 7.4*	62.5 $\pm$ 21.4	30.5 $\pm$ 22.1	0.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 2.0	41.6 $\pm$ 23.4	56.0 $\pm$ 23.2
Pele Normal	6	22.2	2.7 $\pm$ 1.2	66.4 $\pm$ 24.8	30.9 $\pm$ 24.4	0.8 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 1.8	48.5 $\pm$ 13.3	48.8 $\pm$ 15.7
<b>p-Valor<sup>a</sup></b>			<b>0.036</b>	0.620	0.884	0.268	0.600	0.466	0.662

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste Kruskal-Wallis;

\*p<0.05. Dados expressos em forma de média  $\pm$  desvio-padrão

**Tabela 5:** Avaliação da marcação imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$  nas Margens cirúrgicas de CBC da amostra.

	n %		Percentual de células						
			Núcleo			Citoplasma			
			Forte	Fraco	Ausente	Forte	Moderado	Fraco	Ausente
<b>Margens</b>									
Livres	20	74.1	6.9 $\pm$ 7.4	62.5 $\pm$ 21.4	30.5 $\pm$ 22.1	0.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 2.0	41.6 $\pm$ 23.4	56.0 $\pm$ 23.2*
Comprometidas	7	25.9	6.8 $\pm$ 3.5	69.0 $\pm$ 14.1	24.3 $\pm$ 11.1	0.0 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 1.8	61.1 $\pm$ 10.4*	36.4 $\pm$ 11.9
<b>p-Valor<sup>a</sup></b>			0.935	0.808	1.000	0.533	0.400	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste de Mann-Whitney;

\*p<0.05. Dados expressos em forma de média  $\pm$  desvio-padrão

**Tabela 6:** Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em margens de CBC x Pele Normal da amostra analisada.

	n %		Percentual de células						
			Núcleo			Citoplasma			
			Forte	Fraco	Ausente	Forte	Moderado	Fraco	Ausente
Pele normal	6	18.2	3.4 $\pm$ 3.5	60.8 $\pm$ 28.9	35.8 $\pm$ 28.0	0.8 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 1.9	43.7 $\pm$ 16.8	53.0 $\pm$ 19.2
Lesão CBC com margens livres	20	60.6	6.9 $\pm$ 7.4	62.5 $\pm$ 21.4	30.5 $\pm$ 22.1	0.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 2.0	41.6 $\pm$ 23.4	56.0 $\pm$ 23.2
Lesão CBC com margens comprometidas	7	21.2	6.8 $\pm$ 3.5	69.0 $\pm$ 14.1	24.3 $\pm$ 11.1	0.0 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 1.8	61.1 $\pm$ 10.4*	36.4 $\pm$ 11.9
<b>p-valor<sup>a</sup></b>			0.167	0.685	0.570	0.500	0.871	<b>0.042</b>	0.062

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste Kruskal-Wallis;

\*p<0.05. Dados expressos em forma de média  $\pm$  desvio-padrão

**Tabela 7:** Marcação imuno-histoquímica do HIF-1 $\alpha$  em CBC, avaliando-se a ulceração.

		Percentual de células							
		Núcleo			Citoplasma				
n	%	Forte	Fraco	Ausente	Forte	Moderado	Fraco	Ausente	
<b>Ulceração</b>									
Não	16	59.2	8.3 $\pm$ 0.9	58.7 $\pm$ 23.0	33.1 $\pm$ 25.0	0.3 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 2.4	52.4 $\pm$ 22.0	44.4 $\pm$ 22.5
Sim	11	40.8	7.5 $\pm$ 9.2	70.4 $\pm$ 13.8	22.0 $\pm$ 12.5	0.2 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 1.6	46.1 $\pm$ 26.2	51.8 $\pm$ 25.9
<b>p-Valor<sup>a</sup></b>			0.716	0.195	0.195	0.865	0.368	0.422	0.318

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste de Mann-Whitney

**Tabela 8:** Imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  entre subtipos de CBC.

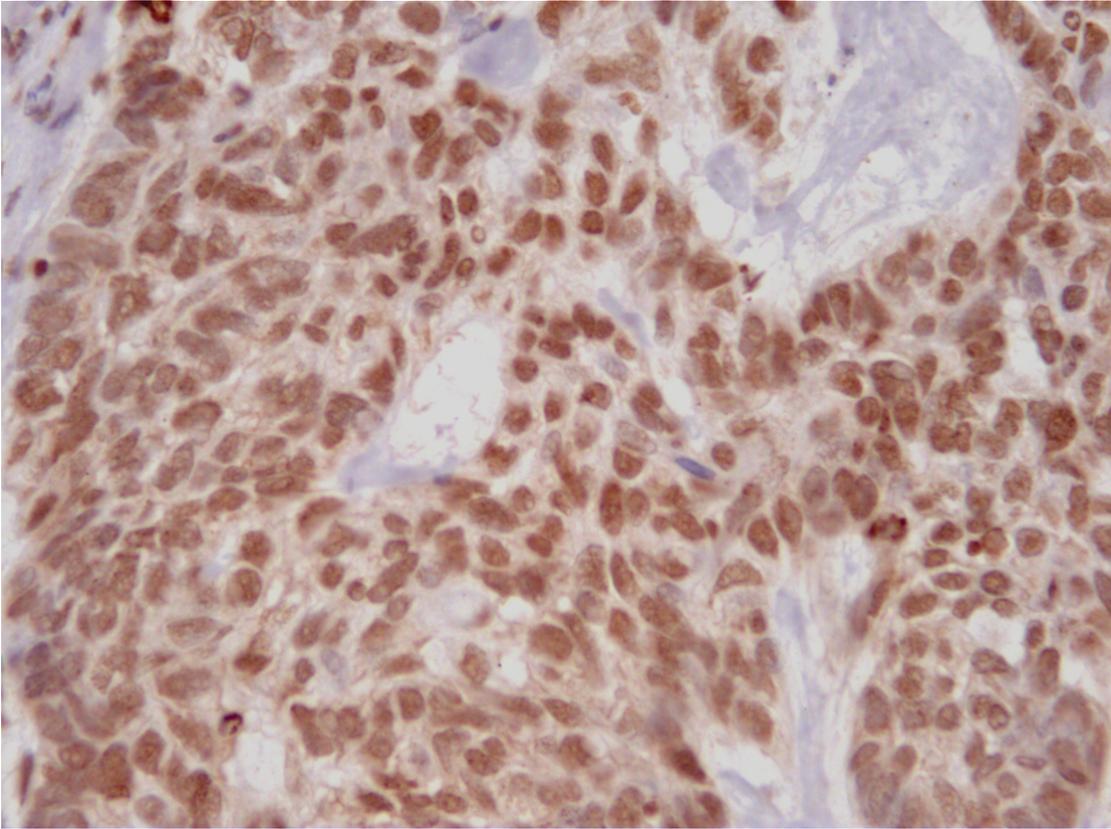
		Percentual de células							
		Núcleo			Citoplasma				
n	%	Forte	Fraco	Ausente	Forte	Moderado	Fraco	Ausente	
<b>Subtipo</b>									
Escamoso	5	18.5	11.5 $\pm$ 13.0	48.7 $\pm$ 28.4	39.8 $\pm$ 33.6	0.1 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 3.0	30.9 $\pm$ 23.2	65.5 $\pm$ 24.6
Infiltrativo	3	11.1	3.9 $\pm$ 3.3	81.3 $\pm$ 10.4	14.8 $\pm$ 8.7	0.5 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 2.2	55.1 $\pm$ 33.7	42.5 $\pm$ 32.0
Nodular	8	29.6	5.9 $\pm$ 3.2	66.3 $\pm$ 19.2	27.8 $\pm$ 18.5	0.1 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 1.6	53.3 $\pm$ 20.8	44.2 $\pm$ 21.1
Sólido	7	25.9	6.3 $\pm$ 1.3	65.8 $\pm$ 9.3	28.1 $\pm$ 10.5	0.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4	45.1 $\pm$ 4.2	52.6 $\pm$ 4.2
Sólido-Cístico	4	14.8	5.6 $\pm$ 3.9	63.3 $\pm$ 9.5	31.2 $\pm$ 11.6	0.1 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.7	39.1 $\pm$ 21.6	60.0 $\pm$ 21.2
<b>p-Valor<sup>a</sup></b>			0.753	0.254	0.476	0.698	0.298	0.171	0.188

Fonte: Dados da pesquisa, 2016.

Notas: <sup>a</sup>Teste Kruskal-Wallis

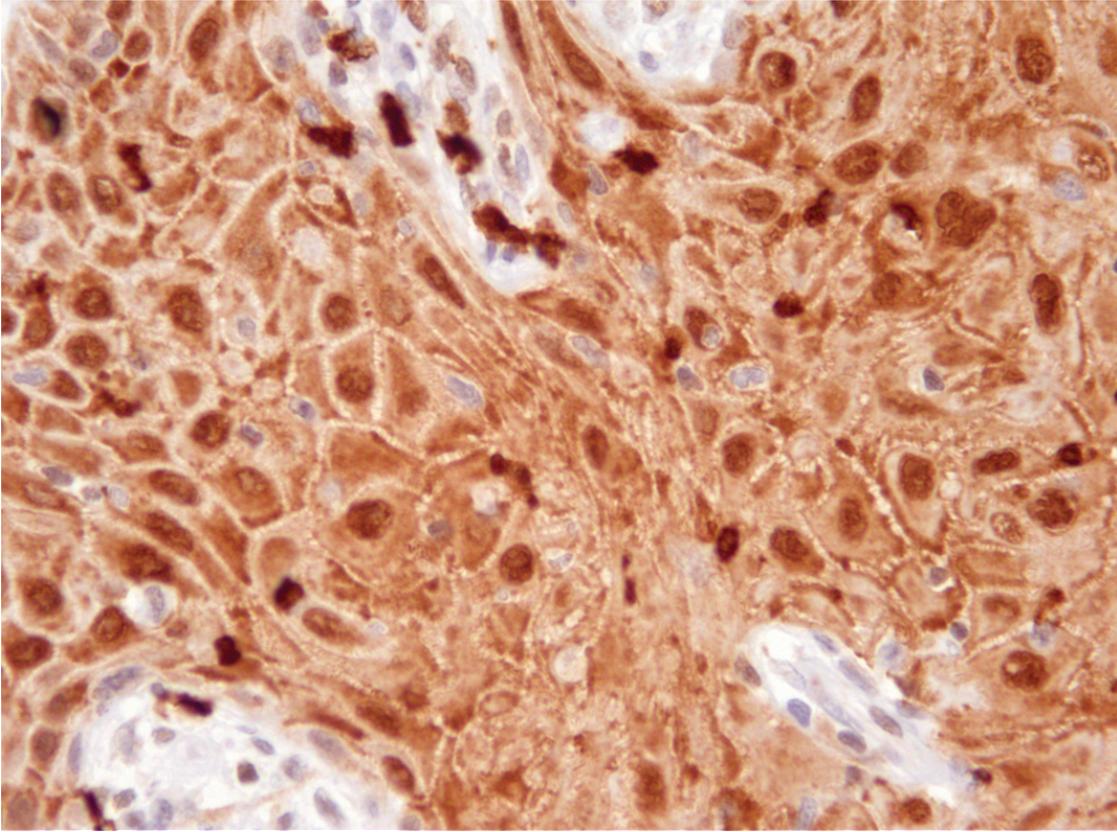
## APÊNDICE B – FIGURAS

**Figura 1**



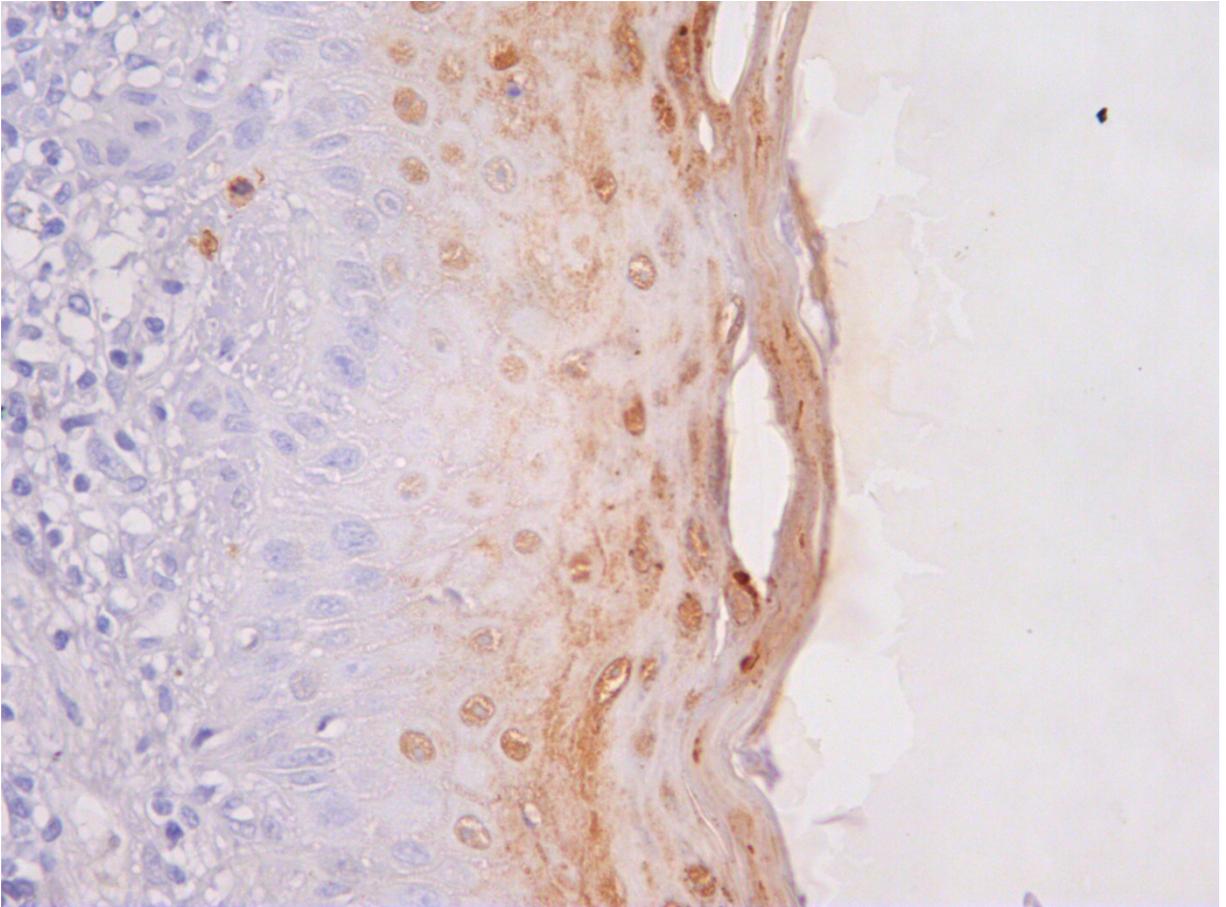
Fotomicrografia exibindo imunoexpressão citoplasmática fraca do HIF-1 $\alpha$  em CBC sólido-cístico (400X)

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

**Figura 2**

Fotomicrografia evidenciando imunomarcção nuclear forte do HIF-1 $\alpha$  em CBC com componente escamoso (400X).

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

**Figura 3**

Fotomicrografia mostrando imunoexpressão do HIF-1 $\alpha$  em tecido epitelial normal (400X).

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2016.

## CONCLUSÃO GERAL

Apesar da escassez de trabalhos envolvendo HIF-1 $\alpha$  e o CBC, o presente estudo revelou a imunomarcção desta proteína nos CBC analisados, tanto imunomarcção nuclear quanto citoplasmática, independentemente de sexo, idade e localização anatômica, acometimento de margens, presença de ulceração ou subtipo histológico. Observou-se, ainda, a diferença importante na imunomarcção do HIF-1 $\alpha$  nas lesões CBC comparadas ao tecido epitelial normal, sugerindo que o Fator Induzido por Hipóxia pode estar envolvido na carcinogênese do CBC.

Nosso estudo sugere que o HIF-1 $\alpha$  pode ser elencado como um possível marcador tumoral para CBC. Portanto, sugere-se que a superexpressão desta proteína pode estar relacionada à malignidade. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar a real participação deste possível marcador no Carcinoma Basocelular.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ANAM MT, ISHIKA A, HOSSAIN MB, JESMIN. A meta-analysis of hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF1A) gene polymorphisms: association with cancers. **Biomark Res**, v. 29, n. 3, 2015.
- APALLA Z. et al. Histopathological study of perilesional skin in patients diagnosed with nonmelanoma skin cancer. **Clin Exp Dermatol**, v. 1, n. 41, p. 21-5, 2016.
- BASILE J et al. Chemokine receptor expression in non-melanoma skin cancer. **J Cutan Pathol.**, v. 35, p. 623-9, 2008.
- BRAHIMI-HORN C, POUYSSÉGUR J. The role of hypoxia-inducible factor-1 in tumor metabolism growth and incasion. **Bull Cancer**, v. 93, n. 8, p. 73-80, 2006.
- BREWER JD et al. Increased incidence and recurrence rates of nonmelanoma skin cancer in patients with non-Hodgkin lymphoma: a Rochester Epidemiology Project population-based study in Minnesota. **J Am Acad Dermatol**, v. 2, n. 72, p. 302-9, 2015.
- BURROWS, N. et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1a in thyroid carcinomas. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n.1, p. 61-72, 2010.
- CHEN CS et al. Ultrasound-guided RNA interference targeting HIF-1 alpha improves the effects of transarterial chemoembolization in rat liver tumors. **Onco Targets Ther**, v. 8, n. 27, p. 3539-48, 2015.
- DEMIRSEREN DD et al. Basal cell carcinoma of the head and neck region: a retrospective analysis of completely excised 331 cases. **J Skin Cancer.**, v. 2014, n. 858636, 2014.
- FELLER L et al. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. **Head Face Med**, v. 1, n. 11, p. 11, 2016.
- GHANADAN A et al. Different Anatomical Distribution of Basal Cell Carcinoma Subtypes in Iranian Population: Association between Site and Subtype. **Ann Dermatol**, v. 5, n. 26, p. 559-63, 2014.
- HE LY et al. Relationship between CD4+CD25+ Treg and expression of HIF-1 $\alpha$  and Ki-67 in NSCLC patients. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 8, n. 19, p. 1351-5, 2015.
- <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp> (Acesso em março/2016).
- KISHIMOTO K et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. **Oral Oncol**, v. 11, n. 48, p. 1120-7, 2012.
- LAHMANN PH et al. A prospective study of measured body size and height and risk of keratinocyte cancers and melanoma. **Cancer Epidemiol**, v. 40, p. 119-25, 2016.

LALLAS A et al.. Dermoscopy in the diagnosis and management of basal cell carcinoma. **Future Oncol**, v. 22, n. 11, p. 2975-84, 2015.

LIDGREN A et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Expression in Renal Cell Carcinoma Analyzed by Tissue Microarray. **European Urology**, v. 50, n. 6, p. 1272-7, 2006.

MARZUKA AG, BOOK SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. **Yale J Biol Med**, v. 2, n. 88, p. 167-79, 2015.

MEDEIROS et al. Collision of malignant neoplasms of the skin: basosquamous cell carcinoma associated with melanoma. **An Bras Dermatol**, v. 1, n. 90, p. 39-42, 2015.

NARAYANAN, D.L.;SALADI, R.N.;Fox, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 9, p. 978-86, 2010.

OLIVEIRA, L.R.;RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, n. 3, p. 298-307, 2011.

PEREIRA KM et al. Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs (Review). **Oncol Lett**, v. 6, n. 2, p. 311-6, 2013.

PÉREZ-SAYÁNS, M.et al. Hypoxia-inducible factors in OSCC. **Cancer Lett**, v. 313, n. 1, p. 1-8, 2011.

RYU, M.H. et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of  $\alpha$ 5 integrin and fibronectin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 1, p. 11-5, 2010.

SANDULACHE VC, MYERS JN. Altered metabolism in head and neck squamous cell carcinoma: an opportunity for identification of novel biomarkers and drug targets. **Head Neck**, v. 2, n. 34, p. 10.1002.

SANTOS M et al. HIF1- $\alpha$  expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 45228, 2012.

SIVRIKOZ ON et al. CXCR-4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin;their relationship with tumor invasiveness and histological subtype.**Turk Patoloji Derg**, v. 1, n. 31, p. 30-5, 2015.

SLATER D, WALSH M. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for the histological reporting of primary cutaneous basal cell carcinoma. **The Royal College of Pathologists (RCP)**. May 2014. England and Wales, n. 261035. G123, v3.

SUÁREZ et al. Occupation and skin cancer: the results of the HELIOS-I multicenter case-control study. **BMC Public Health**, v. 26, n. 7, p. 180, 2007.

TEJERA-VAQUERIZO et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Actas Dermosifiliogr**, v. 16, n. 1-7310, p. 00008-9, 2016.

VASCONCELOS MG et al. Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 9, n. 73, p. 1753-60, 2015.

VIDENOVIC et al. Nonmelanoma Skin Cancer in the Population of the City of Belgrade in the Period 1999-2011. **Srp Arh Celok Lek**, v. 5-6, n. 143, p. 290-5, 2015.

WAN J et al. SOCS3 blocks HIF-1 $\alpha$  expression to inhibit proliferation and angiogenesis of human small cell lung cancer by downregulating activation of Akt, but not STAT3. **Mol Med Rep**, v. 1, n. 12, p. 83-92, 2015.

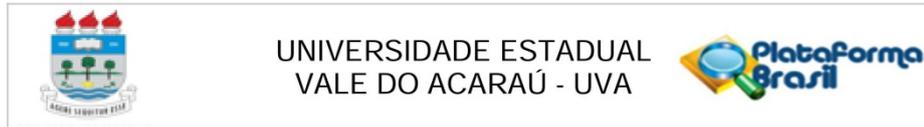
WERMKER et al. Basosquamous Carcinoma of the Head and Neck: Clinical and Histologic Characteristics and Their Impact on Disease Progression. **Neoplasia**, v. 3, n. 17, p. 301-305, 2015.

YU X, LI Z. The role of miRNAs in cutaneous squamous cell carcinoma. **J Cell Mol Med**, v. 1, n. 20, p. 3-9, 2016.

ZHAO Q et al. HIF-1 $\alpha$  Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27<sup>a</sup>. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e0132746, 2015.

ZHENG Y et al. Overexpression of HIF-1 $\alpha$  indicates a poor prognosis in tongue carcinoma and may be associated with tumour metastasis. **Oncol Lett**, v. 4, n. 4, 2013.

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR INDUTOR DE HIPÓXIA (HIF-1) EM CARCINOMA BASOCELULAR E SEUS SUBTIPOS CLÍNICOS

**Pesquisador:** Catarina Maria de Sena

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 48759915.4.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.385.271

#### Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa consistirá de uma análise descritiva, transversal e intencional por intermédio de estudos morfológico e imuno-histoquímico (expressão do fator induzido por hipóxia- HIF-1) nos casos de Carcinoma Basocelular. A população alvo serão todos os casos de carcinomas basocelular em cabeça e pescoço dos pacientes do banco de dados de diagnósticos histopatológicos do Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, dentre o período compreendido entre o início de outubro de 2013 ao final de outubro de 2014.

#### Objetivo da Pesquisa:

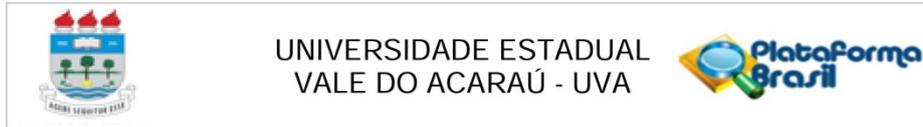
Objetivo Primário:

O propósito deste estudo é analisar a imunexpressão do fator indutor de hipóxia (HIF) nos casos carcinoma basocelular, buscando marcadores de prognóstico para o câncer de pele.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a expressão da proteína HIF-1 em Carcinomas Basocelular através da técnica de imuno-histoquímica;
- Correlacionar a expressão da proteína HIF-1 com os subtipos histológicos dos casos de Carcinoma Basocelular;
- Correlacionar a

**Endereço:** Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.271

expressão da proteína HIF-1 com os parâmetros clínicos dos casos de Carcinoma Basocelular;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos informados: Descoberta de relação nula entre a imunexpressão do biomarcador HIF-1 em Cancer Basocelular.

Benefícios: Descoberta de biomarcadores cancerígenos; Descoberta de novas estratégias terapêuticas.

Observa-se que os riscos informados não estão relacionados aos participantes do estudo mas sim aos resultados do estudo. De todo modo, observa-se que os riscos são mínimos e que os benefícios embora indiretos, sobrepujam os riscos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante pois favorece a melhor compreensão acerca do crescimento do Carcinoma Basocelular, guiando novas estratégias terapêuticas.

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

Os termos obrigatórios estão presentes e redigidos de modo a permitir apreciação ética.

**Recomendações:**

Após conclusão da pesquisa enviar relatório final através da aba notificações desta plataforma.

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

Sem pendência

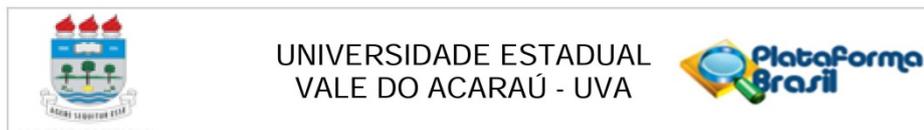
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após apresentação e discussão do parecer pelo relator, decidiu-se por aprovar o protocolo de pesquisa de modo ad referendum do colegiado do CEP/UVA, considerando que as pendências foram atendidas na íntegra. O(a) pesquisador(a) deverá atentar para a necessidade de enviar relatório final após a conclusão do estudo através da aba notificação desta Plataforma.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_575419.pdf	23/11/2015 23:54:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	SolicitacaodedispensaparaTCLEUVA.pdf	23/11/2015 23:54:15	Catarina Maria de Sena	Aceito

**Endereço:** Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 1.385.271

Ausência	SolicitacaodedispensaparaTCLEUVA.pdf	23/11/2015 23:54:15	Catarina Maria de Sena	Aceito
Cronograma	CronogramaparaUVA231115.pdf	23/11/2015 23:53:09	Catarina Maria de Sena	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoaparacomitedeeticauva.doc	23/11/2015 23:52:45	Catarina Maria de Sena	Aceito
Orçamento	orcamentouva.pdf	26/08/2015 11:34:51	Catarina Maria de Sena	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodepesquisadoresuva.pdf	26/08/2015 11:32:22	Catarina Maria de Sena	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostouva.pdf	26/08/2015 11:29:29	Catarina Maria de Sena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeautorizacaoleila.pdf	21/08/2015 13:22:41	Catarina Maria de Sena	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termodefidepositariodraleila.pdf	21/08/2015 13:21:55	Catarina Maria de Sena	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_dr_derwal.pdf	21/08/2015 13:17:55	Catarina Maria de Sena	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_instituicao_dr_vicente.pdf	21/08/2015 13:17:34	Catarina Maria de Sena	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SOBRAL, 07 de Janeiro de 2016

Assinado por:  
Maristela Ines Osawa Chagas  
(Coordenador)

**Endereço:** Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com

# ANEXO B – CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS AND PREVENTION (CEBP): INSTRUCTIONS FOR AUTORS

[← Return to General AACR Journals' Instructions for Authors](#)



SmartSubmit

## Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (CEBP): Instructions for Authors

### Scope

*Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (CEBP)* publishes original peer-reviewed, population-based research on cancer etiology, prevention, surveillance, and survivorship. The following topics are of special interest: descriptive, analytical, and molecular epidemiology; biomarkers including assay development, validation, and application; chemoprevention and other types of prevention research in the context of descriptive and observational studies; the role of behavioral factors in cancer etiology and prevention; survivorship studies; risk factors; and the science of cancer health disparities. Besides welcoming manuscripts that address individual subjects in any of the relevant disciplines, *CEBP* editors encourage the submission of manuscripts with a transdisciplinary approach.

1. **Epidemiology**  
Submissions related to descriptive and analytic studies of human cancer and related disorders as well as studies describing new methods in relevant areas. We also welcome statistical methods and computational models as related to epidemiology, the use of biomarkers for measuring exposure or characterizing disease or precursor conditions, or cancer prevention.
2. **Genetic & Molecular Epidemiology**  
Submissions that include studies of families or unrelated individuals that examine DNA-based or other molecular exposures in relation to cancer.
3. **Nutrition & Energy Balance**  
Submissions on all aspects of nutrition and energy balance and human cancer, including population studies and experimental human feeding and exercise trials, as well as studies describing new methods in relevant areas.
4. **Methods & Models**  
Submissions related to statistical methods or computational models in cancer research. The methods or models should be related to epidemiology; the use of biomarkers for measuring exposure or characterizing disease or precursor conditions; or cancer prevention.
5. **Biomarkers, -Omics & Systems Biology**  
Submissions related to all aspects of the development of biomarkers and the use of -omics approaches for risk, screening, early detection, diagnosis, and molecular classification of human cancer, as well as studies describing new methods in relevant areas.
6. **Biospecimens & Biorepositories**  
Submissions that incorporate any aspects of methodologies for the collection, storage, management, and distribution of biological samples in studies of cancer in humans, as well as studies describing optimal conditions and methods in relevant areas of biospecimen science.
7. **Screening & Early Detection**  
Submissions related to all aspects of the biology of screening and early detection of cancer in humans, as well as studies describing new methods in relevant areas.
8. **Behavioral & Intervention Research**  
Submissions that examine determinants of both risky and protective behaviors as well as interventions to promote risk-reducing behaviors, including smoking cessation and prevention; prevention-, screening and early-detection-associated behaviors; relevant interventions; policy studies; decision-making studies; quality-of-life studies; late effects of cancer treatment and survivorship; and studies describing new methods.
9. **Survivorship & Supportive Care**  
Submissions related to all aspects of both observational and interventional cancer survivorship in humans. Population studies, as well as studies describing new methods in relevant areas, are of particular interest.
10. **Cancer Health Disparities**  
Submissions that explore the differences in cancer prevalence, mortality, survivorship, and burden among specific population groups.
11. **Cancer Surveillance Research**  
Original reports using cancer case and population-based data to examine, test, and develop hypotheses for cancer incidence, mortality, and prevalence.

### Categories of Publication



Descriptions of the types of articles considered for publication are as follows. Note that word counts are exclusive of references. Authors are advised that submissions not adhering to the guidelines provided below may be returned.

#### Original Research Papers

**Research Articles.** Manuscripts that report original studies in epidemiology, biomarkers, prevention, or behavioral sciences relating to cancer that are well-documented, novel, and of high scientific merit.

- 250-word abstract (structured: Background, Methods, Results, Conclusion, Impact)
- 4,000 words of text
- 100 references (meta-analyses and similar articles may require more references)
- 6 figures and/or tables

**Short Communications.** Original research articles of scientific merit of limited scope.

- 250-word abstract (unstructured)
- 2,000 words of text
- 25 or fewer references
- 3 figures and/or tables

**Null Results in Brief.** Original reports of null results of important a priori hypotheses tested with sufficient statistical power. Supplementary Material is generally not to be used to provide additional details about study methods or results.

Please indicate in your cover letter that your submission is for the Null Results in Brief category. In order to ensure timely publication, authors of submissions to this category will be permitted to make only minor revisions to the submitted text. In addition, reviewers' comments may not be provided to authors of rejected manuscripts. Relatively rigid criteria are applied during the evaluation. The submitted manuscript should fulfill the following criteria:

1. The manuscript should add to the current knowledge of cancer in humans (not animals or other experimental systems) and be useful to future investigators making decisions regarding replication and/or inclusion in meta-analysis.
2. Although the manuscript should provide sufficient description of the study so that readers can evaluate the results, detailed study methodology must be described elsewhere (e.g., in prior publications), given limitations to manuscript length. Only methods that bear on the actual results, and that have not been previously reported, should be given. More detailed methods should be referenced.
3. The authors should clearly specify hypotheses that demonstrate a biological rationale for the data being presented. Priority will be given to articles that address well-defined biological pathways; previously reported associations of high impact (including genome-wide associations); adequately powered interactions; and genotyping and haplotyping studies that involve multiple genes.
4. For studies about biomarkers, the assays used should be well validated and biologically meaningful.
5. The statistical power should be equal to or greater than that in prior empirical publications.
6. Studies reporting single biomarkers (including single SNPs, groups of SNPs within a single gene, single diet nutrients and single metabolites measured in blood or biospecimens) will be given low priority for publication. Higher priority will be given to work reporting multiple components of a single pathway or markers for several pathways.
7. Authors are encouraged to combine as much null data as possible into a single publication. Authors are also encouraged to incorporate null data into papers reporting positive findings for pathway markers.

- Include a brief structured abstract (no more than 1–2 sentences each for Background, Methods, Results, Conclusions, and Impact)
- 800 words of text
- 8 or fewer references
- 2 figures and/or tables

---

**Special Sections**

**Letters to the Editor.** Readers are welcome to submit comments on articles recently published in the journal.

- 400 words of text
- 5 references, the first of which should be the original article
- No tables or figures unless approved by the Editor
- Include a title: "Running title of the original article" — Letter

**Reviews and Minireviews.** Review Articles and Minireviews on timely subjects of interest and importance to the readers of *CEBP* are welcome. Unsolicited Review Articles will be considered for publication, and others will be invited by the Editor.

- 200-word abstract (unstructured)
- 6,000 words of text for Review Articles
- 3,500 words of text for Minireviews
- 5 figures and/or tables

**Hypotheses/Commentaries.** Short presentations of original ideas and new insights relating to cancer causes and prevention.

- 200-word abstract (unstructured, 3–5 sentences)
- 3,500 words of text
- 5 figures and/or tables

**Global Perspectives.** Summaries of current national research programs that increase international awareness within the scientific community are welcome.

- 200-word abstract (unstructured, 3–5 sentences)
- 2,000 words of text
- 2 figures and/or tables

---

#### Invited Articles

**Editorials.** Brief papers commenting on articles in the journal.

**Point-Counterpoint.** Articles featuring 2 or more experts in a particular field who present counterbalancing views on a topic of interest to the readership.




---

**CEBP Editorial Office**  
*American Association for Cancer Research* | Publications Division  
 615 Chestnut Street | 17th Floor | Philadelphia, PA 19106-4404  
 Phone: (215) 440-9300 | Fax: (215) 440-9337 | E-mail: [cebp@aacr.org](mailto:cebp@aacr.org)

Updated: 22 January 2015 2:30 PM EST