



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCAS RENNAN DE OLIVEIRA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO  
EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

---

Londrina  
2021

LUCAS RENNAN DE OLIVEIRA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO  
EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A553a Andrade, Lucas Rennan de Oliveira.  
Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em neoplasias benignas e malignas de cabeça e pescoço / Lucas Rennan de Oliveira Andrade. - Londrina, 2021.  
58 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Neoplasias - Cabeça e pescoço - Tese. 2. Enzimas antioxidantes - Tese. 3. Radicais livres - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

LUCAS RENNAN DE OLIVEIRA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO  
EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lourenço  
Cecchini Armani  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Poliana Camila Marinello  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de julho de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente eu gostaria de agradecer à Deus, por tudo que fez, faz e fará em minha vida, por toda oportunidade que me foi dada e por ter me guiado durante todo tempo.

Agradeço a minha família, meu pai (Paulo), mãe (Sueli) e irmão (Alex), por estarem comigo em todas situações, por serem as melhores pessoas que conheço e serem exemplo de dedicação, respeito e valores.

Agradeço a minha namorada (Giovanna), que esteve comigo e meu deu apoio em todos os momentos, sendo verdadeiramente um anjo, cuidando e me ajudando a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Agradeço a professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, por me acolher em seu laboratório, por contribuir para meu crescimento profissional e por compartilhar tanto conhecimento, hoje sou e sempre serei grato por isso.

Agradeço ao professor Dr. André Armani, por sua completa dedicação e colaboração no projeto, indispensáveis para a realização do mesmo. Meu completo respeito e agradecimento.

Agradeço ao professor Dr. Rubens Cecchini, por disponibilizar seu laboratório para que eu pudesse aprender cada dia mais.

Agradeço a todos amigos e gigantes profissionais com quem compartilhei laboratório. A companhia de vocês foi essencial para a realização desse projeto e fez dessa jornada, um momento mais leve, especial e divertido.

Agradeço aos meus fieis amigos, que estão comigo há muito tempo, por toda força e companheirismo, por serem uma engrenagem de amor e amizade me dando força sempre que precisei, jamais saberei agradecer por tanto.

Agradeço a todos os professores do Programa de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, por compartilharem o que sabem, por serem exemplos de profissionais. Meu mais sincero muito obrigado.

Agradeço a equipe técnica, Jesus Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho, por contribuírem diretamente para a realização desse projeto e por serem pessoas incríveis, que fazem o laboratório ser um ambiente leve e feliz.

Agradeço aos pacientes, que mesmo em um momento difícil foram solidários e se doaram para a realização desse projeto, ajudando outras

pessoas no futuro, vocês são incríveis, tem minha completa admiração e respeito.

Agradeço ao Hospital das Clínicas e Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Londrina, ao Hospital Universitário de Londrina (HU-UEL), Hospital do Coração de Londrina e Hospital Norte do Paraná de Arapongas por permitirem a realização do projeto em suas dependências, contribuindo para o crescimento da ciência de maneira direta.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento durante todo período de realização do estudo.

Agradeço a banca de avaliação, constituída pela profa. Dra. Karen Brajão e pela profa. Dra. Poliana Marinello por toda contribuição durante a qualificação e defesa.

Meu sincero agradecimento a todos, envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento dessa pesquisa, eu serei eternamente grato por me proporcionarem viver essa jornada e por me permitirem crescer de tantas maneiras diferentes.

*“São nossas escolhas, Harry, que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades”.*

Alvo Dumbledore.

ANDRADE, Lucas Rennan de Oliveira. **Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Neoplasias Benignas e Malignas de Cabeça e Pescoço**. 2021. 61 páginas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

O termo neoplasia de cabeça e pescoço faz referência a um conjunto de tumores benignos ou malignos, localizados anatomicamente no trato aerodigestivo superior. Podem surgir em vários locais como nas mucosas da boca em regiões como lábios, base da língua, língua, assoalho bucal e palato duro, e na faringe em regiões como orofaringe, hipofaringe e nasofaringe. Em grande parte das situações, a distinção entre tumores benignos e malignos é baseada em aspectos morfológicos. Entretanto, em determinadas situações não existe concordância entre os aspectos do tumor com seu comportamento biológico dificultando o diagnóstico correto. Sabendo do envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento de vários tipos de neoplasias, o objetivo desse trabalho foi determinar os parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em pacientes com alterações benignas e malignas em cabeça e pescoço. Após aprovação pelo conselho de ética, (CEP-UEL nº 3.595.210), foram incluídos 35 indivíduos saudáveis de um banco de dados em nosso laboratório, formando o grupo controle (n=35). No grupo experimental, foram coletadas amostras de sangue de 40 pacientes com lesões benignas e malignas em região de cabeça e pescoço, que foram divididos em dois grupos: BENIGNO (n=9) e CECP (n=31). As amostras de sangue coletadas foram utilizadas para avaliação de parâmetros de estresse oxidativo sistêmico. Um questionário para avaliação de dados clínicos patológicos também foi coletado. Quanto às análises de estresse oxidativo sistêmico, foram avaliados nos eritrócitos a defesa antioxidante mediados pela Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Reduzida (GSH), além da lipoperoxidação de membrana. Os resultados para SOD e CAT mostraram que a atividade dessas enzimas foi maior em relação ao grupo controle. Na análise da GSH, somente o grupo CECP apresentou níveis significativamente reduzidos em relação ao controle. Quando o grupo BENIGNO foi comparado ao CECP nenhuma diferença significativa foi encontrada para os parâmetros citados. Além disso a capacidade conter a lipoperoxidação foi significativamente menor no grupo BENIGNO e CECP. Quando comparado entre si, não foram observadas diferenças relevantes. Pelas análises realizadas, o estresse oxidativo a nível sistêmico foi mais pronunciado em pacientes com neoplasias benignas e malignas em relação ao grupo controle. A análise comparativa entre os grupos não mostrou diferenças estatisticamente relevantes nos marcadores de estresse utilizados neste estudo, o que indica e justifica um aumento do estudo dos tipos de marcadores para estresse oxidativo em neoplasias de cabeça e pescoço.

**Palavras-chave:** Enzimas antioxidantes. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. Radicais Livres.

ANDRADE, Lucas Rennan de Oliveira. **Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Benign and Malignant Head and Neck Neoplasms**. 2021. 61 pages. Master thesis. (Postgraduate Program in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The term head and neck neoplasm refers to a set of benign or malignant tumors, anatomically in the upper aerodigestive tract. They can appear in various places, such as in the mouth mucosa in regions such as the lips, base of the tongue, tongue, mouth floor and hard palate, and in the pharynx in regions such as the oropharynx, hypopharynx and nasopharynx. In most of the hypotheses, the distinction between benign and malignant tumors is based on morphological aspects. However, in certain hypotheses there is no agreement between the aspects of the tumor and its biological behavior, making the correct diagnosis difficult. Knowing the involvement of oxidative stress in the development of various types of neoplasms, the aim of this study was to determine the parameters of systemic oxidative stress in patients with benign and malignant changes in the head and neck. After approval by the ethics board (CEP-UEL nº 3.595.210), 35 included were included, included in a database in our laboratory, forming the control group (n = 35). In no experimental group, blood was collected from 40 patients with benign and malignant lesions in the head and neck region, which were divided into two groups: BENIGNO (n = 9) and CECP (n = 31). Blood collections were used to assess systemic oxidative stress parameters. A questionnaire for evaluating clinical pathological data was also collected. As for the analysis of systemic oxidative stress, the antioxidant defense mediated by Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Reduced Glutathione (GSH) were taken in erythrocytes, in addition to membrane lipoperoxidation. The results for SOD and CAT impartial that the activity of these enzymes was higher compared to the control group. In the analysis of GSH, only the CECP group presented reduced levels in relation to the control. When the BENIGNO group was compared to CECP, no defined difference was found for the mentioned parameters. Furthermore, the ability to contain lipoperoxidation was less compliant in the BENIGNO and CECP groups. When compared to each other, they were not observed relevant. Based on the analyzes performed, systemic oxidative stress is more pronounced in patients with benign and malignant neoplasms compared to the control group. A comparative analysis between groups not statistically differentiated regarding the stress markers used in this study, which indicates and justifies an increase in the study of the types of markers for oxidative stress in head and neck neoplasms.

**Key-words:** Antioxidant Enzymes. Head and Neck Neoplasms. Free radicals.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Características histopatológicas de algumas neoplasias benignas e malignas em Cabeça e Pescoço .....12
- Figura 2** – Estimativa de novos casos de câncer de cabeça e pescoço no Brasil entre 2020-2025 .....13
- Figura 3** – Estimativa de mortes por câncer de cabeça e pescoço no Brasil entre 2020-2025 .....14
- Figura 4** – Atuação das enzimas antioxidantes neutralizando radicais livres .....19

## LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical Hidroxila
ADH	Álcool Desidrogenase
ALDH	Aldeído Desidrogenase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
c-RAF	<i>Proto-oncogene Serine/Threonine Protein Kinase</i> – Proto-oncogene Serina/Treonina Proteína Quinase do RAF
CTCA	Cancer Treatment Centers of America – Centro de Tratamento de Câncer da América
Cu/ZnSOD	Cobre Zinco Superóxido Dismutase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EO	Estresse Oxidativo
ERK1	<i>Extracellular Signal-regulated Kinases 1</i> – Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular 1
ERK2	<i>Extracellular Signal-regulated Kinases 2</i> – Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular 2
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i> – Observatório Global de Câncer
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de Dihidrogênio
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> – Fator Indutível por Hipóxia
HPV	Papiloma Vírus Humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer

MnSOD	Manganês Superóxido Dismutase
NO·	Óxido Nítrico
NO <sup>-2</sup>	Nitritos
NO <sup>-3</sup>	Nitratos
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2</i> – Fator Eritróide Nuclear 2
O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>	Ânion Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitritos
ORF	<i>Open Read Frames</i> – Fase de Leitura Aberta
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PI3K	<i>Fosfatidilinositol-3-cinase</i> – Fosfoinositideo 3 Quinase
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RAS	<i>Rat Sarcoma Virus</i> – Vírus do Sarcoma de Rato
SOD	Superóxido Dismutase
WHO	World Health Organization – Organização Mundial da Saúde
4HNE	4-hidroxinonenal
8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina

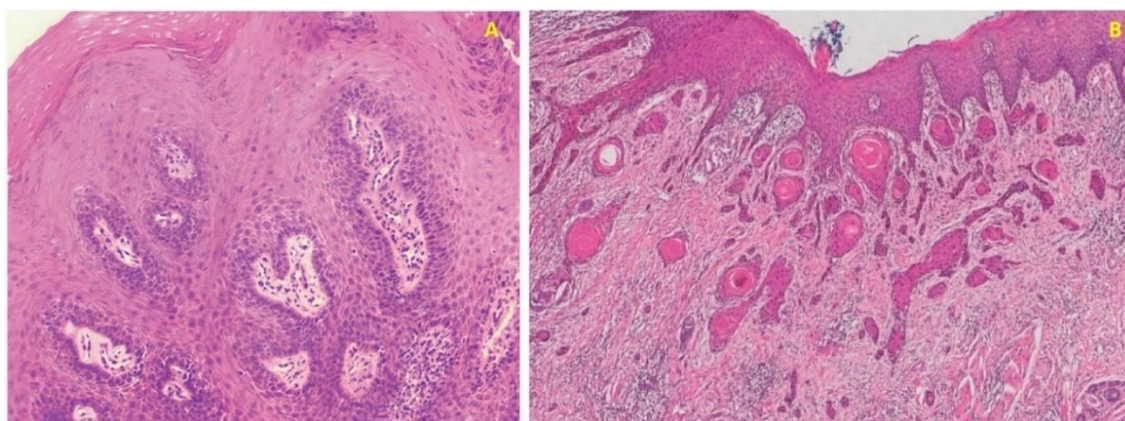
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
1.1	NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO .....	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO .....	18
1.3	RELAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM AS NEOPLASIAS 4 DE CABEÇA E PESCOÇO .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	26
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	27
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 2 1.1 NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO

3 O termo neoplasia de cabeça e pescoço faz referência a um conjunto de  
4 tumores localizados anatomicamente no trato aerodigestivo superior (DAHIYA  
5 & DHANKHAR, 2016). Podem surgir em vários locais como nas mucosas da  
6 boca em regiões como lábios, base da língua, língua, assoalho bucal e palato  
7 duro, e na faringe em regiões como orofaringe, hipofaringe e nasofaringe  
8 (ROCHA & CARIA, 2013). Com relação à distribuição anátomo-topográfica dos  
9 tumores, 40% são originados em cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe  
10 e os 20% restantes são distribuídos nos demais sítios. O papiloma escamoso  
11 de cavidade oral é um dos exemplos mais comuns de neoplasia benigna de  
12 cavidade oral (FIGURA 1A) (ANDRADE et al., 2019). Das neoplasias malignas,  
13 o carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais frequente,  
14 representando 95% dos casos (FIGURA 1B). (SANTOS, BATISTA,  
15 CANGUSSU, 2010).

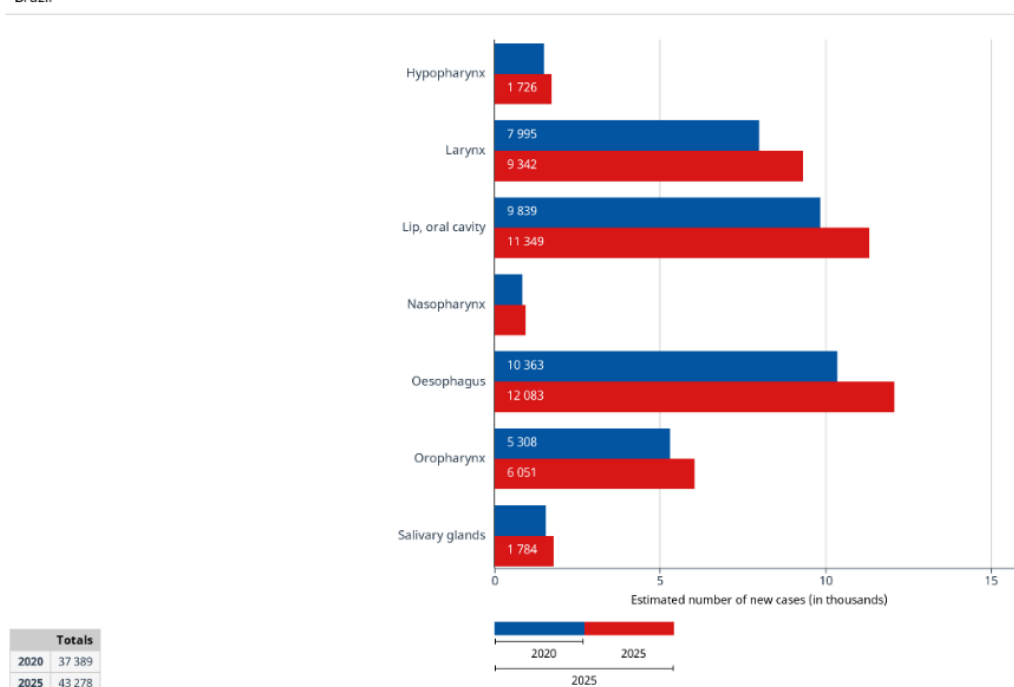


18 **Figura 1 – (A)** Papiloma escamoso de cavidade oral com presença de  
19 acantose, papilomatose, hiperqueratose e células escamosas com halo  
20 perinuclear claro e binucleações raras. Ausência de coilocitose. HE. Aumento  
21 10x (Fonte: Adaptado de Andrade et al., 2019). **(B)** Carcinoma de células  
22 escamosas de cavidade oral. Ilhas de tumor podem ser vistas infiltrando os  
23 tecidos conjuntivos profundamente ao epitélio oral subjacente. Carcinoma  
24 moderadamente diferenciado com um padrão invasivo não coeso (Fonte:  
25 Adaptado Speight & Farthing, 2018).

26 Segundo dados do *GLOBOCAN* (*Global Cancer Observatory, 2018*)  
27 foram estimados no mundo, 650 mil novos de Carcinoma Epidermóide de  
28 Cabeça e Pescoço (CECP) e aproximadamente 330.000 mortes anualmente

1 representando o sexto câncer mais comum. No Brasil, são estimados para  
 2 2020-2022, 11.180 novos casos para o sexo masculino e 4.010 para o sexo  
 3 feminino correspondendo a um risco estimado de 10,69 para os homens e 3,71  
 4 para as mulheres a cada 100 mil habitantes (INCA, 2020). Além disso, outro  
 5 dado que sugere um importante crescimento de CECP no Brasil, é a estimativa  
 6 de novos casos realizada pela *International Agency for Research on Cancer*  
 7 (IARC). Segundo o IARC, em torno de 43.278 novos casos (Figura 2) serão  
 8 notificados e 28.243 indivíduos irão a óbito até 2025 (Figura 3) (IARC, 2020).  
 9

Estimated number of new cases from 2020 to 2025, Both sexes, age [0-85+]  
 Brazil

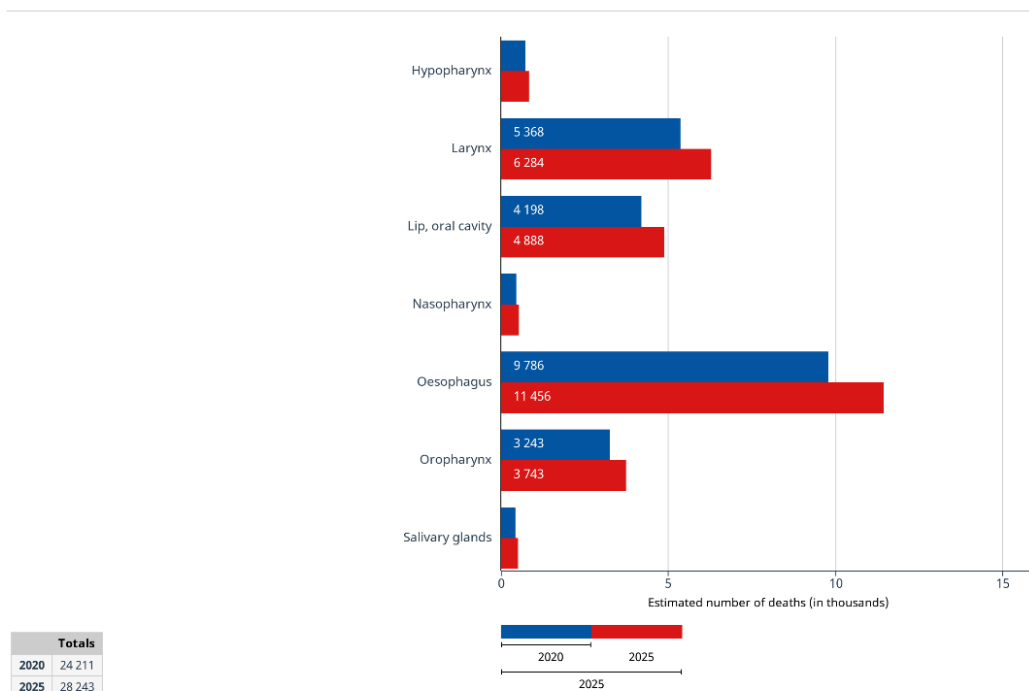


IARC - All Rights Reserved 2020

10  
 11  
 12  
 13  
 14

**Figura 2** – Estimativa de novos casos de câncer de cabeça e pescoço no Brasil entre 2020-2025. (Fonte: IARC, 2020).

Estimated number of deaths from 2020 to 2025, Both sexes, age [0-85+]  
Brazil



IARC - All Rights Reserved 2020

1

2

3 **Figura 3** – Estimativa de mortes por câncer de cabeça e pescoço no  
4 Brasil entre 2020-2025. (Fonte: IARC, 2020).

5

6

7 Os sinais e sintomas são variados e podem aparecer na boca, nos seios  
8 paranasais, no nariz ou na garganta e incluem ferida ou nódulo que não  
9 cicatriza, dor de garganta persistente, dificuldade para engolir e mudanças na  
10 voz (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Os pacientes relatam dores locais  
11 nos ouvidos e pescoço, em algumas circunstâncias complicações ao engolir e  
12 rouquidão com tom de voz anormal e dificuldade na fala (SCHIFF, 2018). Na  
13 garganta é descrito dificuldade ao engolir, dor ou secura. No pescoço é descrito  
14 aumento de gânglios linfáticos ou nódulo e em menor intensidade observa-se  
15 afta, anormalidade no paladar, perda de peso e sangramentos (INCA, 2020).

16 Tanto fatores intrínsecos como extrínsecos são responsáveis pelo  
17 surgimento do CECP. Como fatores intrínsecos pode-se destacar a idade,  
18 etnia, sexo, mutações espontâneas e/ou herdadas (GALBIATTI et al., 2013).  
19 Como fatores extrínsecos pode-se destacar o tabagismo, etilismo, infecções  
20 virais, má-higiene bucal, dietas pobres em vegetais e exposição à radiação  
ultravioleta (DHULL et al., 2018).

1 O tabagismo é um dos principais fatores de risco e a mutagênese  
2 induzida pelos componentes do cigarro já é bem estabelecida. Os cigarros  
3 possuem mais de 4.700 substâncias tóxicas e cerca de 60 substâncias são  
4 consideradas carcinogênicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos,  
5 aminas aromáticas e nitrosaminas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND  
6 PREVENTION (US; NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE  
7 PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US; OFFICE ON SMOKING AND  
8 HEALTH (US, 2010). Em média, 80% dos CECP são atribuídos à exposição a  
9 esses componentes presentes no cigarro. Os fumantes têm dez vezes mais  
10 chances de desenvolver câncer quando comparados aos não fumantes  
11 (ANDRADE, SANTOS, OLIVEIRA, 2015). Além disso, o etilismo é outro fator  
12 importante que associado ao tabagismo, atua em sinergia promovendo  
13 alterações passíveis de transformação neoplásica (ANDRADE, SANTOS,  
14 OLIVEIRA, 2015).

15 O HPV é amplamente aceito pela comunidade científica como um fator  
16 de risco para vários cânceres como o câncer de colo de útero, de vulva, vagina,  
17 pênis, anal, e o próprio CECP (WHO, 2020). A associação entre o HPV e as  
18 lesões em células escamosas foi descrita pela primeira vez em 1983 por  
19 Syrjänen e colaboradores. Alguns anos depois, a literatura forneceu evidências  
20 que o HPV, principalmente de alto risco é um fator independente para o  
21 surgimento de câncer orofaríngeo (LETO et al., 2011).

22 A velocidade no diagnóstico de pacientes com neoplasia benigna ou  
23 maligna de cabeça e pescoço é uma etapa fundamental para a sobrevida dos  
24 pacientes. Quando o diagnóstico é realizado de maneira precoce, a taxa de  
25 sobrevida dos pacientes pode atingir 70 – 90%, ultrapassando a média mundial  
26 de sobrevida estimada em 46% (FILHO, 2013).

27 O tratamento para as neoplasias de cabeça e pescoço pode ser  
28 cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou a combinação desses métodos. Em  
29 estágio inicial, onde não é observado comprometimento linfonodal e o tumor  
30 apresenta-se menor do que 2cm (T1, N0, M0), a remoção cirúrgica é suficiente  
31 para o tratamento efetivo. Porém, quando é observado invasão de tecido  
32 adjacente, certamente haverá comprometimento de linfonodos regionais  
33 alterando o estadiamento da neoplasia para T2, T3 ou até T4 levando a  
34 escolha do tratamento combinado (GALBIATTI et al, 2013).

1 Vale destacar que na grande maioria das situações, a distinção entre  
2 tumores benignos e malignos é baseada em sua morfologia com considerável  
3 confiança. Ocasionalmente, apesar dos esforços dos patologistas, alguns  
4 tumores dificultam essa caracterização. Alguns aspectos podem sugerir  
5 tumores benignos enquanto outras apontam para um potencial maligno  
6 (ROBBINS & COTRAN, 2010). Existem situações em que não existe  
7 concordância entre os aspectos do tumor com seu comportamento biológico.  
8 De maneira geral, tumores benignos e malignos podem ser diferenciados com  
9 base em sua diferenciação e anaplasia, taxa de crescimento, capacidade de  
10 invasão e metástase (INCA, 2020).

11 O termo diferenciação se refere à extensão com que as células do  
12 parênquima tumoral benigno se assemelham as células do parênquima normal,  
13 com base em sua morfologia e função (INCA, 2020). Nos tumores benignos, as  
14 células se apresentam bem diferenciadas na maioria das vezes com estrutura  
15 típica do tecido de origem. Nos tumores malignos, as células podem se  
16 apresentar bem diferenciadas com relação as células do tecido de origem, ou  
17 completamente indiferenciadas (KIM et al., 2020). Além disso, nos tumores  
18 malignos é observado falta de diferenciação com anaplasia com estrutura  
19 frequentemente atípica (ROBBINS & COTRAN, 2010).

20 Uma questão fundamental na biologia dos tumores é a taxa de  
21 crescimento e os fatores que influenciam no desfecho clínico e nas respostas  
22 terapêuticas. A taxa de crescimento de um tumor é determinada por três  
23 fatores, são eles: o tempo de duplicação das células tumorais, a fração das  
24 células tumorais que se encontram no grupo replicativo e a taxa com que as  
25 células são perdidas ou morrem (CTCA, 2017). Nos tumores benignos, a taxa  
26 de crescimento é geralmente progressiva e lenta, podendo atingir um ponto de  
27 paralisação ou até mesmo regredir (INCA, 2020). São observadas figuras  
28 mitóticas raras e normais. Já nos tumores de fenótipo maligno, são observadas  
29 uma taxa de crescimento instável, e pode ser desde lenta até rápida. Figuras  
30 mitóticas podem ser numerosas e anormais (IARC, 2020).

31 Com relação a invasão local, tumores benignos crescem como uma  
32 massa expansiva coesa, permanecendo localizada em seu sítio de origem  
33 além de não possuir capacidade de infiltrar, invadir ou metastizar (COOPER,  
34 2018). Devido ao seu crescimento lento, geralmente desenvolvem uma

1 margem de tecido conjuntivo comprimido sendo referido como cápsula fibrosa,  
2 derivada da matriz extracelular do tecido nativo por meio da atrofia das células  
3 parenquimatosas normais que estão sob pressão do tumor benigno em  
4 crescimento (INCA, 2020). A grande maioria dos tumores malignos não  
5 reconhece margens anatômicas normais, dificultando muito a ressecção  
6 cirúrgica (COOPER, 2018). Nessas situações são removidas margens de  
7 tecido normal afim de evitar o reaparecimento do câncer (KIM et al., 2020). No  
8 CECP, a remoção de uma margem de segurança traz complicações  
9 importantes, uma vez que a região anatômica onde os tumores surgem são  
10 pequenas (IARC, 2020). Sendo assim, o principal tratamento pode trazer  
11 consigo sequelas para toda vida, como complicações na fala, alimentação e  
12 deglutição além da baixa autoestima (American Society Cancer, 2019).

13 Por fim, um dos fatores mais importantes para a gravidade dos tumores  
14 é a metástase. Metástase é definido como um implante tumoral descontínuo  
15 com o tumor primário (Australian Government Cancer, 2014). A capacidade  
16 de invasão dos tumores malignos permite que eles atinjam a corrente  
17 sanguínea, vasos linfáticos e cavidades corpóreas promovendo sua  
18 disseminação. Vale ressaltar que quanto mais indiferenciado um tumor primário  
19 é, maior a probabilidade da realização de metástase (INCA, 2020). Felizmente,  
20 tumores benignos não realizam metástase devido à ausência de invasão e sua  
21 lenta velocidade de crescimento (IARC, 2020).

22 Sendo assim, a avaliação das diferentes características das neoplasias,  
23 como morfologia, comportamento biológico, diferenciação celular, taxa de  
24 crescimento, capacidade de invasão e metástase fornece informações capazes  
25 de distinguir uma neoplasia benigna de uma neoplasia maligna na maioria das  
26 situações. Entretanto, nem sempre esses parâmetros são suficientes para o  
27 diagnóstico correto. Portanto, é necessário a identificação de marcadores  
28 moleculares, como os de estresse oxidativo como meio para auxiliar no  
29 diagnóstico correto dos tumores, permitindo assim a escolha adequada do  
30 tratamento.

31

32

33

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

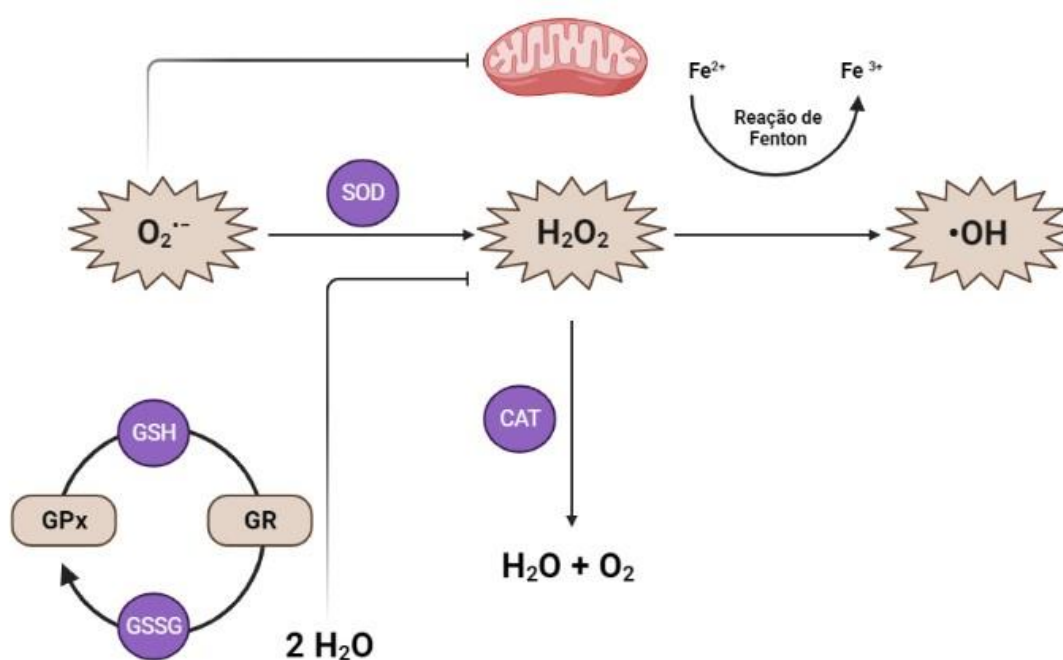
O estresse oxidativo (EO) é definido como desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e sua neutralização pelo sistema de defesa antioxidante (SOSA et al., 2013). As espécies reativas são produzidas de maneira fisiológica em diversas reações bioquímicas no nosso organismo, como na geração de ATP (adenosina trifosfato) e na cadeia transportadora de elétrons (KUMAR et al., 2012). No organismo, as espécies reativas estão envolvidas em vários processos fisiológicos como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas (DI MEO; VENDITTI, 2020). Quando em excesso, apresentam efeitos colaterais importantes como danos em DNA, modificação oxidativa das proteínas e peroxidação lipídica das membranas levando a perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos culminando em morte celular (KUDRYAVTSEVA et al., 2016).

Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) enquanto espécie reativa de nitrogênio (ERN) ocorre quando o elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de nitrogênio (KAMINSKY & ZHIVOTOVSKY, 2014). As ERO são distribuídas em dois grupos: radicalares como: radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), e os não radicalares: como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Das ERN podemos destacar o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (VEAL et al., 2007; KAMINSKY & ZHIVOTOVSKY, 2014).

Os agentes antioxidantes são definidos como qualquer substância, que quando presente em baixas concentrações em relação do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a sua oxidação (SIES, 2015). É considerado um importante mecanismo utilizado pelas células para minimizar danos causados pelas espécies reativas. Esse sistema é constituído por antioxidantes enzimáticas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona Peroxidase (GPx) e não enzimáticos como a glutaciona, vitaminas C e E (SIES, 2015).

A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes no balanço redox sendo responsável por dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio.

1 Ela possui duas isoformas: SOD1 (Cu/ZnSOD) sendo encontrada  
 2 preferencialmente no citoplasma enquanto a SOD2 (MnSOD) é mais observada  
 3 na mitocôndria (FUKAI & FUKAI, 2011). O peróxido de hidrogênio é originado  
 4 pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos pela dismutação do ânion superóxido. Possui  
 5 ação antimicrobiana pois é capaz de oxidar a membrana celular, levando a  
 6 morte do microrganismo (FANG; VÁZQUEZ-TORRES, 2019). Na ausência de  
 7 metais de transição, o peróxido de hidrogênio é pouco reativo a moléculas  
 8 orgânicas. Entretanto, na presença de ferro e cobre, pela Reação de Fenton,  
 9 pode ser convertido em radical hidroxila (LAROSA & REMACLE, 2018). A  
 10 catalase é outro importante sistema antioxidante encontrado em hemácias, rins  
 11 e fígado, convertendo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BRIEGER  
 12 et al., 2012). O grupamento tiol (-SH) mais abundante nas células é  
 13 representado pela glutathiona, encontrado principalmente em hepatócitos e  
 14 hemácias sendo composto por duas enzimas: são elas a glutathiona peroxidase  
 15 (GPx) e a glutathiona redutase (GR) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Esse  
 16 sistema opera em ciclos entre as formas oxidada e reduzida da glutathiona  
 17 (GSSG-GSH), além de atuar dismutando o peróxido de hidrogênio em água e  
 18 oxigênio da mesma forma que que a catalase (AQUILANO; BALDELLI;  
 19 CIRIOLO, 2014). A Gpx é responsável pela conversão da GSH em GSSG em  
 20 situações de EO. Esse processo pode ser revertido pela ação da GR,  
 21 convertendo GSSG em GSH novamente (FUKAI & FUKAI, 2011).



1 **Figura 4 – Atuação das enzimas antioxidantes neutralizando radicais**  
2 **livres.** Por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD)  
3 catalisa a geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do radical  
4 superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). As enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) se  
5 integram para impedir o acúmulo de  $H_2O_2$  que, apesar de não ser um radical  
6 livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo  
7 dessa espécie reativa ( $H_2O_2$ ) possibilita por meio da reação da *Fenton* e *Haber*  
8 *Weiss*, a geração do radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), contra o qual não existe defesa  
9 enzimática. A GPx reduz o  $H_2O_2$  à água, no entanto o faz às custas da  
10 conversão da glutaciona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última que  
11 promove ação oxidante em função da ligação de dissulfeto existente em sua  
12 estrutura. CAT: catalase; Fe: ferro; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona  
13 oxidada; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona redutase;  $H_2O_2$ : peróxido  
14 de hidrogênio;  $H_2O$ : água;  $O_2^{\cdot-}$ : ânion superóxido;  $O_2$ : oxigênio;  $\cdot OH$ : radical  
15 hidroxila; SOD: superóxido dismutase. (Fonte: Próprio Autor).  
16

17 O sistema antioxidante não enzimático inclui especialmente compostos  
18 originados da dieta como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (HE et al.,  
19 2017). Esse tipo de defesa pode ser dividido em antioxidante lipofílicos como a  
20 vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), e hidrofílicos como a vitamina C (ácido ascórbico). É  
21 importante destacar que o potencial antioxidante de componentes não  
22 enzimáticos depende de algumas variáveis como a absorção,  
23 biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática e o tipo  
24 de espécie oxidativa gerada no microambiente (BARBOSA et al., 2010).

25 A vitamina E, possui um importante papel antioxidante nas membranas  
26 celulares por apresentar um caráter lipossolúvel se acumulando no interior das  
27 membranas celulares (MIYAZAWA et al., 2019). É encontrada no fígado, tecido  
28 adiposo, e músculo, possuindo capacidade de interromper a propagação da  
29 lipoperoxidação atuando assim, na manutenção da estabilidade das  
30 membranas celulares (LIGUORI et al., 2018). A vitamina C é encontrada nos  
31 tecidos humanos e desempenha papéis fundamentais como agente redutor,  
32 reduzindo metais de transição como o ferro e cobre presentes sítios ativos de  
33 enzimas ou biodisponíveis no organismo (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).  
34

### 35 1.3 RELAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM AS NEOPLASIAS DE 36 CABEÇA E PESCOÇO

37

38 Em 1863, Rudolf Virchow sugeriu que a origem do câncer se dava a  
39 partir de sítios de inflamação crônica, associados a fatores que aumentam a

1 proliferação celular (VIRCHOW, 1863). Certamente que a manutenção da  
2 proliferação celular em um microambiente rico em células inflamatórias, fatores  
3 de crescimento e agentes indutores de alterações de DNA, como as espécies  
4 reativas, promove ou potencializa as chances do desenvolvimento de um  
5 câncer (REUTER et al., 2010). Em situações de inflamação, as células se  
6 multiplicam enquanto o tecido é regenerado, e a proliferação cessa quando o  
7 agente agressor é eliminado e o tecido é restabelecido. Entretanto, se as  
8 células em multiplicação possuírem mutações em genes relacionados a  
9 proliferação celular, elas continuarão se multiplicando, uma vez que o  
10 microambiente fornece todos elementos necessários para isso ocorrer  
11 (FILOMENI & CECCONI, 2015).

12 Portanto, o estresse oxidativo e a inflamação são considerados  
13 componentes importantes em processos fisiológicos e patológicos no  
14 organismo. No modelo clássico de carcinogênese, o estresse oxidativo está  
15 envolvido em suas três etapas principais: iniciação, promoção e progressão  
16 (GOUVEIA & LIMA, 2017). Na iniciação, ocorre mutação crítica, irreversível no  
17 DNA, em uma célula normal, tornando-a preparada ou iniciada. A 8-  
18 hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) é considerada o principal produto de  
19 modificação de DNA por espécies reativas de oxigênio e em maior  
20 concentração em vários tipos tumorais como no CECP (CUNHA et al., 2017).

21 Durante a promoção, as células iniciadas sofrem ação de agentes  
22 carcinogênicos por um longo período de maneira gradual (INCA, 2020). Essa  
23 fase é caracterizada pela expansão clonal de células iniciadas, pela indução da  
24 proliferação celular e/ou inibição de mecanismos de apoptose (KATAKWAR et  
25 al., 2016). A progressão envolve alterações genéticas, que desencadeiam  
26 alterações estruturais e funcionais nas células modificando vias de transdução  
27 de sinal de modo que as ERO podem estimular a expansão clonal de células  
28 mutadas modulando temporariamente fatores de transcrição como o Nrf2  
29 (Fator Eritróide Nuclear 2), HIF (Fator Indutível por Hipóxia) e a proteína p53  
30 responsáveis pelo controle do ciclo celular, além de atuar em nível de  
31 transdução de sinal para exercer funções de pró-sobrevivência tumoral (LEE et  
32 al., 2019). Isso pode resultar na inativação de proteínas pró-apoptóticas e na  
33 regulação positiva de genes anti-apoptóticos (CUNHA et al., 2017). As ERO  
34 podem afetar vias de proliferação celular controladas pela proteína quinase

1 regulada por sinal extracelular (ERK1) e (ERK2) e a fosfoinositideo 3 quinase  
2 (PI3K) (MONIRUZZAMAN et al., 2018).

3 A geração de grandes quantidades de ERO na progressão, pode  
4 contribuir para mutar ou inibir antiproteinasas, aumentar a regulação das  
5 metaloproteinasas da matriz e lesar os tecidos locais favorecendo a metástase  
6 do tumor (HORI et al., 2019). Níveis aumentados de bases de DNA  
7 modificadas por oxidação podem contribuir para a instabilidade genética e o  
8 potencial metastático de células tumorais em câncer totalmente desenvolvido  
9 (JENA, 2012; WHITAKER et al., 2017). Além disso, as ERO são relatadas  
10 como cruciais para desencadear a resposta angiogênica, sendo um importante  
11 componente na proliferação e metástase do câncer. Isso sugere que as ERO  
12 estão envolvidas em todos esses estágios da carcinogênese (SCHIEBER &  
13 CHANDEL, 2014).

14 A fumaça do cigarro contém uma variedade de substâncias mutagênicas  
15 e indutoras de câncer bem estabelecidas, como hidrocarbonetos aromáticos  
16 policíclicos (PAH), nitrosaminas, benzopirenos e aldeídos. Esses componentes  
17 estão diretamente relacionados com o surgimento de diversos tipos de  
18 cânceres, incluindo o câncer de pulmão, CECP, bexiga e pâncreas além de se  
19 relacionarem com o surgimento de doenças respiratórias e cardiovasculares  
20 (JETHWA & KHARIWALA, 2017).

21 A fumaça do cigarro possui três frações principais: gasosa, particulada e  
22 alcatrão. O complexo quinona-hidroquinona forma o principal grupo da fração  
23 alcatrão da fumaça do cigarro participando na redução do oxigênio a ânion  
24 superóxido. Os elementos presentes na fase gasosa são substâncias  
25 altamente reativas que quando em contato com os grupos tióis, levam a  
26 redução dos níveis desse antioxidante, de modo que se estabeleça um  
27 desequilíbrio entre a concentração de espécies reativas e a capacidade de  
28 defesa antioxidante (MARGHAM et al., 2016).

29 As ERO e ERN são capazes de lesar componentes essenciais para o  
30 funcionamento das células como o DNA, proteínas e lipídeos (GUPTA et al.,  
31 2014). As alterações genéticas induzidas por ERO, como mutações e rearranjo  
32 cromossômicos, estão diretamente relacionadas com todas etapas da  
33 carcinogênese (KUMAR & KHANDELWAL, 2012). Portanto, o  
34 desenvolvimento do tumor se dá por erros no reparo, replicação ou na correção

1 de quebras de fita (GLYNOS et al., 2018). O 8-OHdG é um dos principais  
2 produtos de modificação induzida por ERO resultando na transição de bases  
3 nitrogenadas G – C, T – A (KUMAR et al., 2012). O dano oxidativo ao DNA,  
4 pode alterar a expressão gênica, resultando em aumento da expressão de  
5 fatores de crescimento e proliferação, além de modificar vias de transdução de  
6 sinal, como as controladas pelas proteínas c-RAF e RAS (KUMAR &  
7 KHANDELWAL, 2012). O acúmulo de 8-OHdG no DNA leva ao surgimento de  
8 várias mutações pontais, reduzindo ou interrompendo completamente a  
9 expressão de genes supressores tumorais como o p53 e o RAS, contribuindo  
10 para a instabilidade genômica, agravamento do prognóstico e potencial  
11 metastático das células tumorais (KUMAR & KHANDELWAL, 2012).

12 Em algumas situações, as ERO podem formar adutos de DNA. Os  
13 adutos de DNA são definidos como um produto de adição de duas ou mais  
14 moléculas diferentes, resultando em um único produto de reação contendo  
15 todos os átomos de todos componentes iniciais (BASU, 2018). Nitratos de  
16 origem dietética após a absorção intestinal, chegam à saliva por meio das  
17 glândulas salivares. Na saliva, são convertidos em nitrito pela nitrato redutase  
18 derivada de bactérias comensais e em contato com a nicotina do cigarro,  
19 produz nitrosaminas, que atuam como promotores na carcinogênese induzida  
20 pelo cigarro (SONG; WU; GUAN, 2015; KARWOWSKA; KONONIUK, 2020). Na  
21 presença de oxigênio, o óxido nítrico é convertido em Trióxido de dihidrogênio  
22 ( $H_2O_3$ ), causando desaminação de bases nitrogenadas, além de reagir com N-  
23 nitrotirosinas causando danos em DNA pelo processo de alquilação (SONG;  
24 WU; GUAN, 2015).

25 Em pacientes fumantes, foi observado um aumento significativo da  
26 atividade da Cu/ZnSOD1 e CAT quando comparada com indivíduos não  
27 fumantes. Já a GPx eritrocitária, se mostrou com valores reduzidos em  
28 pacientes fumantes quando comparada com não fumantes (AGARWAL et al.,  
29 2019). Essas informações justificam a análise de parâmetros de estresse  
30 oxidativo em neoplasias benignas e malignas de cabeça e pescoço, levando  
31 em consideração que 95% desses tumores tem relação com hábitos  
32 tabagistas.

33 O consumo de bebidas alcoólicas tem aumentado significativamente nos  
34 últimos anos e cada vez mais são observadas em populações mais jovens

1 envolvidas com esse tipo de droga (WHO, 2018; MONTEIRO, 2020). O álcool é  
2 capaz de modificar a permeabilidade da mucosa bucal, alterando a barreira  
3 lipídica das células epiteliais que normalmente impediria a entrada de  
4 componentes externos e a desidratação (RATNA & MANDREKAR, 2017). Por  
5 esse mecanismo, agentes carcinogênicos como os presentes no cigarro,  
6 podem penetrar mais facilmente na mucosa bucal e causar câncer, explicando  
7 a atuação sinérgica do cigarro e álcool (LEITE et al., 2021). A rota comum de  
8 degradação do álcool se inicia na transformação do álcool em acetaldeído pela  
9 enzima álcool desidrogenase (ADH). Em seguida o acetaldeído é convertido  
10 em acetado pelo aldeído desidrogenase (ALDH) de modo que na cavidade oral,  
11 os níveis de ALDH são relativamente menores, sendo assim, os pacientes  
12 etilistas crônicos que consomem alto volume de bebidas alcoólicas, podem  
13 acumular acetaldeído e assim desenvolveram danos em DNA (CEDERBAUM,  
14 2012). No fígado, o etanol é oxidado pelo citocromo P450 2E1 à acetaldeído  
15 que é posteriormente oxidado a acetato (GUENGERICH, 2020). A ingestão  
16 crônica de etanol pode induzir polimorfismo de nucleotídeo único de CYP2E1  
17 (GUENGERICH, 2020). O aumento da atividade do CYP2E1 resultante leva ao  
18 aumento da geração de ERO, o que leva à peroxidação lipídica e seus  
19 produtos, como o 4-hidroxinonenal (4HNE), que se liga ao DNA formando  
20 adutos mutagênicos (GUENGERICH, 2020).

21 O HPV é considerado um importante fator de risco pra inúmeros  
22 cânceres incluindo o CECP (YANG et al., 2019). Expressa duas proteínas  
23 consideradas oncogênicas, E6 e E7, as quais estão envolvidas com a  
24 inativação da proteína p53 e da a proteína do retinoblastoma (RB)  
25 respectivamente, causando uma desregulação do ciclo celular das células  
26 infectadas, processo fundamental para a carcinogênese mediada pelo vírus  
27 (ZUR HAUSEN, 2002; VIDAL, GILLISON, 2008; SENAPATI, SENAPATI,  
28 DWIBEDI, 2016). A expressão de uma isoforma curta da proteína E6 de formas  
29 oncogênicas de alto risco de HPV aumentam o nível de ERO em células HPV-  
30 positivas e HPV-negativas, juntamente com a diminuição da expressão de  
31 SOD2 e GPx (LIOU & STORZ, 2010). No microambiente tumoral, ocorre  
32 elevação da atividade metabólica nas células cancerosas associada hipóxia  
33 tecidual resultante do crescimento tumoral que elevam a expressão dos fatores  
34 de crescimento e contribuem para o aumento da síntese de espécies reativas

1 de oxigênio (LIOU, STORZ, 2010; BHATTACHARYYA, SAHA, 2015). Além  
2 disso as células tumorais possuem uma resistência maior a insultos quando  
3 comparadas com células normais (MARINELLO et al., 2019). O HPV de  
4 maneira muito interessante, é capaz de se adaptar a condições de estresse  
5 oxidativo modulando as defesas antioxidantes enzimáticas, como a SOD e a  
6 CAT em células infectadas (SHIM et al., 2008; CALAF, URZUA, 2018).  
7 Levando em consideração que os principais fatores de risco são capazes de  
8 induzir ou até mesmo modular o estresse oxidativo, analisar o comportamento  
9 das enzimas antioxidantes bem como os biomarcadores de lipoperoxidação em  
10 pacientes com neoplasias benignas e malignas de cabeça e pescoço é de  
11 grande importância.

12

13

14

## 1           2       **OBJETIVO GERAL**

2

3           Determinar os parâmetros de estresse oxidativo sistêmico em pacientes  
4 com alterações benignas e malignas em cabeça e pescoço.

5

### 6           2.1    **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

7

- 8           • Determinar as características clínico-patológicos e demográficas dos  
9           pacientes com neoplasia benigna e maligna de cabeça e pescoço.
- 10          • Analisar e comparar marcadores de estresse oxidativo sistêmico dos  
11          grupos com neoplasia e do banco de dados de controle saudável.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Este trabalho originou um artigo científico que foi incluído nesse trabalho como Apêndice. Todas análises práticas foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina, no Centro de Ciências Biológicas – CCB/UEL, Departamento de Patologia Experimental nos laboratórios de Patologia Molecular e laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A critério de caracterização da população de estudo, observamos que o sexo masculino foi mais acometido em ambas neoplasias. A média de idade foi de 57 e 63 anos para pacientes com neoplasia benigna e maligna respectivamente. Hábitos como tabagismo e etilismo também foram constantemente observados em ambos grupos analisados. Doenças crônicas como diabetes tipo II e hipertensão não foram frequentemente observadas em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço. O histórico pessoal de câncer também foi pouco observado. O histórico familiar de câncer foi frequentemente relatado por ambos grupos analisados, sendo um importante fator predisponente ao desenvolvimento de neoplasias. O desconhecimento sobre o HPV foi bastante observado em nossa população de estudo. Nenhum dos pacientes de ambos grupos foram imunizados para o HPV. Hábitos de higiene oral relatados pelos pacientes foram considerados normais na maioria das situações.

Pelas análises realizadas, o estresse oxidativo a nível sistêmico foi mais pronunciado em pacientes com neoplasias benignas e malignas em relação ao grupo controle. A análise comparativa entre os grupos não mostrou diferenças estatisticamente relevantes nos marcadores de estresse utilizados neste estudo, o que indica e justifica um aumento do estudo dos tipos de marcadores para estresse oxidativo. O câncer de boca e orofaringe possui um alto índice de recorrência local e regional, e um alto índice de metástase, duas características as quais indicam um tipo de câncer altamente agressivo e de caráter inflamatório, onde o estresse oxidativo deve ter participação, como observado em outros tipos de cânceres com estas mesmas características. Portanto, a ampliação deste estudo se faz necessária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

AGARWAL, P., BAGEWADI, A., KELUSKAR, V., VINUTH, D.P. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase antioxidant enzymes in chronic tobacco smokers and chewers: a case-control study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 30, n. 2, p. 219, 2019.

American Cancer Society. Guidelines for primary care providers. **CA Cancer Journal Clin.** 2019.

ANDRADE, J.O.M., SANTOS, C.A.S.T., OLIVEIRA MÁRCIO, C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 894-905, 2015.

ANDRADE, S. A., PRATAVIEIRA, S., PAES, J. F., RIBEIRO, M. M., BAGNATO, V. S., & VAROTTI, F. D. P. Papiloma escamoso oral: uma visão sob aspectos clínicos, de fluorescência e histopatológicos. **Einstein** (São Paulo), v. 17, 2019.

AQUILANO, K., BALDELLI, S., CIRIOLO, M.R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 196, 2014.

ASMAT, U., ABAD, K., & ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

Australian Government Cancer. Australia. Invasion and metastasis | **EdCaN**, 2014.

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.D.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., & BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.

BASU, A.K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 970, 2018.

BHATTACHARYYA, S.; SAHA, J. Tumour, oxidative stress and host T cell response: cementing the dominance. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 82, n. 6, p. 477-488, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - INCA, Rio de Janeiro; 2020.

BRIEGER, K., SCHIAVONE S., MILLER F.J.J.R., KRAUSE, K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. w13659, 2012.

CALAF, G.M., URZUA, U., TERMINI, L., AGUAYO, F. Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v. 9, n. 34, p. 23824, 2018.

- 1 Cancer Treatment Center of America, A. What's the difference? Benign and  
2 malignant tumors, **CTCA**. 2017.  
3
- 4 CEDERBAUM, A.I. Alcohol metabolism. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 4,  
5 p. 667-685, 2012.  
6
- 7 Center for Disease Control and Prevention. Chemistry and Toxicology of  
8 Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm. In: **How Tobacco  
9 Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-  
10 Attributable Disease: A Report of the Surgeon General**. Centers for Disease  
11 Control and Prevention (US), 2010.  
12
- 13 COOPER, G.M. The Development and Causes of Cancer (2000). **The Cell: A**,  
14 2018.  
15
- 16 CUNHA, L.L., MORARI, E.C., NONOGAKI, S., MARCELLO, M.A., SOARES,  
17 F.A., VASSALLO, J., WARD, L.S. Interleukin 10 expression is related to  
18 aggressiveness and poor prognosis of patients with thyroid cancer. **Cancer  
19 Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 2, p. 141-148, 2017.  
20
- 21 DAHIYA, K., DHANKHAR, R. Updated overview of current biomarkers in head  
22 and neck carcinoma. **World Journal of Methodology**, v. 6, n. 1, p. 77, 2016.  
23
- 24 DHULL, A.K., ATRI, R., DHANKHAR, R., CHAUHAN, A.K., KAUSHAL, V.  
25 Major risk factors in head and neck cancer: a retrospective analysis of 12-year  
26 experiences. **World Journal of Oncology**, v. 9, n. 3, p. 80, 2018.  
27
- 28 DI MEO, S., VENDITTI, P. Evolution of the knowledge of free radicals and other  
29 oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.  
30
- 31 FANG, F.C., VÁZQUEZ-TORRES, A. Reactive nitrogen species in host-  
32 bacterial interactions. **Current Opinion in Immunology**, v. 60, p. 96-102, 2019.  
33
- 34 FILOMENI, G., DE ZIO, D., CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the  
35 clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**, v.  
36 22, n. 3, p. 377-388, 2015.  
37
- 38 FUKAI, T., USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling,  
39 vascular function, and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6,  
40 p. 1583-1606, 2011.  
41
- 42 GALBIATTI, A.L., PADOVANI-JUNIOR, J.Á., MANÍGLIA, J.V., RODRIGUES,  
43 C.D., PAVARINO, É.C., GOLONI-BERTOLLO, E.M. Câncer de cabeça e  
44 pescoço: causas, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of  
45 Otorhinolaryngology**, v. 79, p. 239-247, 2013.  
46  
47  
48  
49

- 1 GLYNOS, C., BIBLI, S.I., KATSAOUNOU, P., PAVLIDOU, A., MAGKOU, C.,  
2 KARAVANA, V., TOPOUZIS, S., KALOMENIDIS, I., ZAKYNTHINOS, S.,  
3 PAPAPETROPOULOS, A. Comparison of the effects of e-cigarette vapor with  
4 cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. **American Journal**  
5 **of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 315, n. 5, p.  
6 L662-L672, 2018.
- 7  
8 GOUVEIA, S., LIMA, A.A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a  
9 promoção carcinogênica. Braz. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical**  
10 **Research**, v. 20, n. 3, p. 174-179, 2017.
- 11  
12 GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease. **Chemico-**  
13 **biological interactions**, v. 322, p. 109056, 2020.
- 14  
15 GUPTA, R. K., PATEL, A. K., SHAH, N., CHOUDHARY, A. K., JHA, U. K.,  
16 YADAV, U. C., PAKUWAL, U. Oxidative stress and antioxidants in disease and  
17 cancer: a review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 11, p.  
18 4405-4409, 2014.
- 19  
20 HE, L., HE T., FARRAR, S., JI, L., LIU, T. M.A.X. Antioxidants maintain cellular  
21 redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular**  
22 **Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.
- 23  
24 HORI, R., SHINOHARA, S., KOJIMA, T., KAGOSHIMA, H., KITAMURA, M.,  
25 TATEYA, I., TAMAKI, H., KUMABE, Y., ASATO, R., HARADA, H., KITANI, Y.,  
26 TSUJIMURA, T., HONDA, K., ICHIMARU, K., OMORI, K. Real-world outcomes  
27 and prognostic factors in patients receiving nivolumab therapy for recurrent or  
28 metastatic head and neck carcinoma. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1317, 2019.
- 29  
30 HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P., FÁTIMA, A. Glutathiona e enzimas relacionadas:  
31 papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31,  
32 n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- 33  
34 JENA, N.R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and  
35 repair. **Journal of biosciences**, v. 37, n. 3, p. 503-517, 2012.
- 36  
37 JETHWA, A.R., KHARIWALA, S.S. Tobacco-related carcinogenesis in head  
38 and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 3, p. 411-423,  
39 2017.
- 40  
41 KAMINSKY, V.O., ZHIVOTOVSKY, B. Free radicals in cross talk between  
42 autophagy and apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 86-  
43 102, 2014.
- 44  
45 KARWOWSKA, M., KONONIUK, A. Nitrates/nitrites in food—Risk for nitrosative  
46 stress and benefits. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 241, 2020.
- 47  
48 KATAKWAR, P., METGUD, R., NAIK, S., MITTAL, R. Oxidative stress marker  
49 in oral cancer: a review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.  
50 12, n. 2, p. 438, 2016.

- 1  
2 KIM, H.Y., JUNG, E.K., LEE, D.H., YOON, T.M., LEE, J.K., LIM, S.C. Clinical  
3 difference between benign and malignant tumors of the hard palate. **European**  
4 **Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 277, n. 3, p. 903-907, 2020.  
5  
6 KUDRYAVTSEVA, A.V., KRASNOV, G.S., DMITRIEV, A.A., ALEKSEEV, B.Y.,  
7 KARDYMON, O.L., SADRIDINOVA, A.F., FEDOROVA, M.S., POKROVSKY,  
8 A.V., MELNIKOVA, N.V., KAPRIN, A.D., MOSKALEV, A.A., SNEZHKINA, A.V.  
9 Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and  
10 cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 44879, 2016.  
11  
12 KUMAR, A., PANT, M.C., SINGH, H. S., KHANDELWAL, S. Determinants of  
13 oxidative stress and DNA damage (8-OhdG) in squamous cell carcinoma of  
14 head and neck. **Indian Journal of Cancer**, v. 49, n. 3, p. 309, 2012.  
15  
16 KUMAR, A., PANT, M.C., SINGH, H.S., KHANDELWAL, S. Assessment of the  
17 redox profile and oxidative DNA damage (8-OHdG) in squamous cell carcinoma  
18 of head and neck. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 8, n. 2, p.  
19 254, 2012.  
20  
21 KUMAR, Vinay. Robbins & Cotran **Patologia Bases Patológicas das**  
22 **Doenças 8ª Edição**. Elsevier Brasil, 2010.  
23  
24 LAROSA, V., REMACLE, C. Insights into the respiratory chain and oxidative  
25 stress. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, p. BSR20171492, 2018.  
26  
27 LEE, S., HALLIS, S.P, JUNG, K.A, RYU, D., KWAK, M.K. Impairment of HIF-1 $\alpha$ -  
28 mediated metabolic adaption by NRF2-silencing in breast cancer cells. **Redox**  
29 **Biology**, v. 24, p. 101210, 2019.  
30  
31 LEITE, R.B., MARINHO, A.C.O., COSTA, B.L., LARANJEIRA, M.B.V.,  
32 ARAÚJO, K.D., & CAVALCANTI, A.F. The influence of tobacco and alcohol in  
33 oral cancer: literature review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**  
34 **Laboratorial**, v. 57, 2021.  
35  
36 LETO, M.G.P., SANTOS JÚNIOR, G.F.D., PORRO, A.M., & TOMIMORI, J.  
37 Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e  
38 manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 306-317,  
39 2011.  
40  
41 LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE,  
42 D., GARGIULO, G., TESTA, G., CACCIATORE, F., BONADUCE, D., ABETE,  
43 P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v.  
44 13, p. 757, 2018.  
45  
46 LIOU, G.Y., STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical**  
47 **Research**, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.  
48  
49

- 1 MARGHAM, J., MCADAM, K., FORSTER, M., LIU, C., WRIGHT, C., MARINER,  
2 D., PROCTOR, C. Chemical composition of aerosol from an e-cigarette: a  
3 quantitative comparison with cigarette smoke. **Chemical Research in**  
4 **Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1662-1678, 2016.
- 5  
6 MARINELLO, P.C., PANIS, C., SILVA, T.N.X., BINATO, R., ABDELHAY, E.,  
7 RODRIGUES, J.A., MENCALHA, A.L., LOPES, N.M.D., LUIZ, R.C., CECCHINI,  
8 R., CECCHINI, A.L. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7  
9 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell  
10 adaptation genes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- 11  
12 MIYAZAWA, T., BURDEOS, G.C., ITAYA, M., NAKAGAWA, K., MIYAZAWA, T.  
13 Vitamin E: regulatory redox interactions. **IUBMB Life**, v. 71, n. 4, p. 430-441,  
14 2019.
- 15  
16 MONIRUZZAMAN, M., GHOSAL, I., DAS, D., CHAKRABORTY, S.B. Melatonin  
17 ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFκB  
18 pathway. **Biological Research**, v. 51, 2018.
- 19  
20 MONTEIRO, M. G. A iniciativa SAFER da Organização Mundial da Saúde e os  
21 desafios no Brasil para a redução do consumo nocivo de bebidas alcoólicas.  
22 **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020000, 2020.
- 23  
24 RATNA, A., MANDREKAR, P. Alcohol and cancer: Mechanisms and  
25 therapies. **Biomolecules**, v. 7, n. 3, p. 61, 2017.
- 26  
27 REUTER, S., GUPTA, S.C., CHATURVEDI, M.M., AGGARWAL, B.B. Oxidative  
28 stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology**  
29 **and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- 30  
31 ROCHA, C.P.; CROCI, C.S.; CARIA, P.H.F. Is there relationship between  
32 temporomandibular disorders and head and cervical posture? A systematic  
33 review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 40, n. 11, p. 875-881, 2013.
- 34  
35 SANTOS, L.C., BATISTA ODE, M., CANGUSSU, M.C. Characterization of oral  
36 cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Brazilian Journal of**  
37 **Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 4, p. 416-422, 2010.
- 38  
39 SCHIEBER, M., CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative  
40 stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.
- 41  
42 SCHIFF, B. Overview of head and neck tumors. **Montefiore Medical Center,**  
43 **The University Hospital of Albert Einstein College of Medicine**, 2018.
- 44  
45 SENAPATI, R., SENAPATI, N.N., DWIBEDI, B. Molecular mechanisms of HPV  
46 mediated neoplastic progression. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p.  
47 1-11, 2016.
- 48  
49  
50

- 1 SHIM, J.H., KIM, K.H., CHO, Y.S., CHOI, H.S., SONG, E.Y., MYUNG, P.K.,  
2 KANG, J.S., SUH, S.K., PARK, S.N., YOON, D.Y. Protective effect of oxidative  
3 stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. **Amino Acids**, v. 34, n.  
4 1, p. 135-141, 2008.
- 5  
6 SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox**  
7 **Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.
- 8  
9 SONG, P., WU, L., GUAN, W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake  
10 and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9872-  
11 9895, 2015.
- 12  
13 SOSA, V., MOLINÉ, T., SOMOZA, R., PACIUCCI, R., KONDOH, H.,  
14 LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research**  
15 **Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.
- 16  
17 SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. The pathology of oral cancer. **British**  
18 **Dental Journal**, v. 225, n. 9, p. 841-847, 2018.
- 19  
20 VEAL, E.A., DAY, A.M., MORGAN, B.A. Hydrogen peroxide sensing and  
21 signaling. **Molecular Cell**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007.
- 22  
23 VIDAL, L., GILLISON, M. L. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a  
24 distinct disease type. **Hematology/oncology Clinics of North America**, v. 22,  
25 n. 6, p. 1125-1142, 2008.
- 26  
27 VIRCHOW, R. **Cellular Pathology as Based Upon Physiological and**  
28 **Pathological Histology**. JB Lippincott, 1863.
- 29  
30 WHITAKER, A.M., SCHAICH, M.A., SMITH, M.R., FLYNN, T.S.,  
31 FREUDENTHAL, B.D. Base excision repair of oxidative DNA damage: from  
32 mechanism to disease. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 22, p.  
33 1493, 2017.
- 34  
35 World Health Organization; International Agency for Research on Cancer  
36 (IARC). **GLOBOCAN 2018**, Estimated Cancer Incidence and Worldwide in  
37 2018.
- 38  
39 World Health Organization; International Agency for Research on Cancer  
40 (IARC). Estimated Cancer Incidence and Worldwide in 2020.
- 41  
42 World Healthy Organization; Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer.  
43 **World Health Organization**, 2020.
- 44  
45 World Healthy Organization; Management of Substance Abuse Team. Global  
46 status report on alcohol and health 2018. Geneva: **World Health Organization**,  
47 2018.
- 48

- 1 YANG, D., SHI, Y., TANG, Y., YIN, H., GUO, Y., WEN, S., WANG, B., NA, C.,
- 2 WU, Y., GAO, W. Effect of HPV infection on the occurrence and development of
- 3 laryngeal cancer: a review. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 19, p. 4455, 2019.
- 4
- 5 ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical
- 6 application. **Nature reviews cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.
- 7

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

**APÊNDICES**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

**APÊNDICE A – Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Benign and  
Malignant Head and Neck Neoplasms**

1           **Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Benign and Malignant**  
2                                   **Head and Neck Neoplasms**

3  
4           Lucas Rennan de Oliveira Andrade<sup>1</sup>; Natália Medeiros Dias Lopes<sup>1</sup>;  
5   Larissa Juliani Sanches<sup>1</sup>; Thiago Henrique Daniel do Nascimento<sup>1</sup>; Julya Karen  
6   Bianchi<sup>1</sup>; Ademar Takahama Junior<sup>4</sup>; Rubens Cecchini<sup>2</sup>; André Armani<sup>3</sup>;  
7                                   Alessandra Lourenço Cecchini<sup>1</sup>.

8  
9                           <sup>1</sup>State University of Londrina, Laboratory of Molecular Pathology,  
10   Londrina, PR, Brazil.

11                           <sup>2</sup>State University of Londrina, Laboratory of Physiopathology and  
12   Free Radicals, Londrina, PR, Brazil.

13                           <sup>3</sup>State University of Londrina, Department of Clinical Surgery,  
14   Londrina, PR, Brazil.

15                           <sup>4</sup>State University of Londrina, Department of Dental Clinic,  
16   Londrina, PR, Brazil.

17  
18           Corresponding Author: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

19           E-mail: [alcecchini@uel.br](mailto:alcecchini@uel.br)

20           Fax: +55 (43) 3371 42 67

21           Phone: +55 (43) 3371 4529

22  
23           Laboratory of Molecular Pathology, Universidade Estadual de Londrina,  
24   21 Highway Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 University Campus, Londrina,  
25   CEP 86057-22 970, Paraná, Brazil.

26

27

28

29

30

## 1           **Abstract**

2   **Introduction and Objective:** The term head and neck neoplasm refers to a set  
3 of benign or malignant tumors, located anatomically in the upper aerodigestive  
4 tract. In most situations, the distinction between benign and malignant tumors is  
5 based on morphological aspects. However, in certain situations there is no  
6 agreement between the aspects of the tumor and its biological behavior, making  
7 the correct diagnosis difficult. The aim of this work was to determinate the  
8 parameters of systemic oxidative stress in patients with head and neck benign  
9 and malignant neoplasms. **Methods:** After approval by the ethics committee,  
10 (CEP-UEL nº 3.595.210), 40 participants with benign and malignant lesions in  
11 the head and neck region (experimental group) and 35 healthy individuals  
12 (control group) were enrolled in this study. The experimental group was divided  
13 into two groups: BENIGN (n=9) and HNSCC (n=31). The collected blood  
14 samples were used to assess systemic oxidative stress parameters. A  
15 questionnaire for evaluating clinical pathological data was also collected. Data  
16 from the medical record were also used. **Results:** Both experimental groups  
17 showed that SOD and CAT were higher compared to the control group. In the  
18 analysis of GSH, only the HNSCC group showed significantly reduced levels  
19 compared to the control. When the BENIGN group was compared to HNSCC,  
20 no significant difference was found for the mentioned parameters. Furthermore,  
21 the ability to contain lipoperoxidation was significantly lower in the BENIGN and  
22 HNSCC groups. **Conclusion:** The oxidative stress was more pronounced in the  
23 groups with benign and malignant neoplasms compared to the control group.  
24 The oxidative parameters evaluated in this study were not different between the  
25 experimental groups. However, head and neck cancer has aggressive  
26 characteristics of local and regional recurrence and metastasis that qualify for a  
27 more in-depth study of these parameters.

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40   **Keywords:** Antioxidant Enzymes. Head and Neck Neoplasms. Free radicals.

## 1           **Introduction**

2  
3           Neoplasms located anatomically in the upper aerodigestive tract are  
4 defined as head and neck tumors (DAHIYA & DHANKHAR, 2016). Which has  
5 subdivisions based on the region of origin, that is, oral neoplasia includes  
6 tumors that appeared in the region of the lips, base of the tongue, tongue, oral  
7 floor and hard palate. In the pharynx, they are subdivided into nasopharynx,  
8 oropharynx and hypopharynx (ROCHA & CARIA, 2013). Regarding benign  
9 neoplasms, the most frequent tumor in the salivary glands is the pleomorphic  
10 adenoma, while in the mucosa are the papillomas, in addition to lipomas in  
11 adipose tissue and connective tissue fibromas (INCA, 2020). For head and neck  
12 cancers, squamous cell carcinoma is the most frequent, representing 95% of  
13 cases, being observed mainly in men (SANTOS, BATISTA, CANGUSSU,  
14 2010). Considered one of the ten most common types of tumors worldwide,  
15 affecting about 650,000 people each year (ROCHA & CARIA, 2013). In Brazil,  
16 the estimate of new cases of oral cancer expected for each year of the 2020-  
17 2022 triennium is 11,180 for males and 4,010 for females (INCA, 2020).

18           The main risk factors for head and neck squamous cell cancer (HNSCC)  
19 are well known and its carcinogenic potential is well described. Smoking,  
20 alcoholism and viral infections, mainly caused by high-risk human papilloma  
21 virus (HPV), are considered the main factors capable of inducing neoplastic  
22 transformation (DHULL et al., 2018). Other factors such as age, ethnicity, sex  
23 and hereditary or spontaneous mutations also favor the development of this  
24 cancer (GALBIATTI et al., 2013). About 80% of HNSCC originates from the  
25 smoking habit, affecting mainly men over 50 years of age (ANDRADE,  
26 SANTOS, OLIVEIRA, 2015). Chronic alcoholism is also an important factor  
27 related to the development of HNSCC. The consumption of high doses of  
28 alcoholic beverages favors the increase in the permeability of the oral mucosa,  
29 facilitating the entry tobacco of carcinogenic agents, increasing the chances of  
30 developing cancer (RATNA & MANDREKAR, 2017). Furthermore, the  
31 accumulation of acetaldehyde originating from the normal metabolism of alcohol  
32 in the oral cavity may be related to the formation of the 4-hydroxynonenal  
33 (4HNE) adduct (GUENGERICH, 2020). This evidence shows the synergistic

1 action of smoking with alcoholism, multiplying the chances of developing  
2 HNSCC (LEITE et al., 2021).

3 HPV is considered an important risk factor for several types of cancer,  
4 including HNSCC. HPV expresses two proteins considered oncogenic, E6 and  
5 E7, which are involved with the inactivation of p53 protein and retinoblastoma  
6 protein (pRB), respectively, causing a disruption in the cell cycle of infected  
7 cells, a fundamental process for virus-mediated carcinogenesis (ZUR HAUSEN,  
8 2002; VIDAL, GILLISON, 2008; SENAPATI, SENAPATI, DWIBEDI, 2016). It is  
9 important to highlight that the main risk factors are responsible in most  
10 situations for inducing or even modulating oxidative stress, being directly  
11 involved in the pathophysiology of head and neck tumors (AMERICAN  
12 CANCER SOCIETY, 2019).

13 Therefore, knowing the different characteristics of head and neck tumors  
14 is an important step in choosing the proper treatment. Oxidative parameters to  
15 better characterize benign and malignant neoplasms can be useful in the  
16 differentiation and diagnosis of these neoplastic lesions.

17

## 18 **Methods and Materials**

19

### 20 *Study population and design*

21

22 The study was approved by the Ethics Committee for Research with  
23 Human Beings of the State University of Londrina CAAE no.  
24 20516119.4.0000.5231). For the control group, 35 healthy individuals were  
25 selected from a database in our laboratory matching age, gender and habits.  
26 Cancer history, family history of cancer, risk habits such as smoking, alcohol  
27 consumption and HPV infection were used as exclusion criteria.

28 In the experimental group, 40 patients with benign and malignant lesions  
29 in the head and neck region were recruited at the Hospital das Clínicas and  
30 Dental Clinic of the State University of Londrina, University Hospital of Londrina  
31 (HU-UEL), Hospital do Coração de Londrina and Hospital Norte from Paraná de  
32 Arapongas during September 2019 to April 2021. Patients were classified into 2  
33 groups: BENIGN group (n=09) and HNSCC group (n=31). Blood samples were  
34 collected before surgery to analyze systemic oxidative stress parameters. A

1 questionnaire was applied to obtain the patients demographic and clinical  
2 pathological data. All samples from patients were processed and analyzed at  
3 the Molecular Pathology Laboratory of the State University of Londrina - UEL.

#### 4 5 *Blood samples*

6  
7 Peripheral blood was obtained by venipuncture from all participants in a  
8 heparin tube for plasma and a tube without additives for serum. All material was  
9 centrifuged at 3500rpm for 5 minutes at 4°C. Serum and plasma contents were  
10 stored at -20°C. The erythrocytes were washed three times with 1mL of 0.9%  
11 sodium chloride solution for 5 minutes at 4°C and then stored in Alsever at 4°C  
12 for a maximum period of two weeks.

#### 13 14 *Systemic oxidative stress parameters*

15  
16 The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was determined  
17 using the method developed by Marklund and Marklund, (1974) in erythrocytes.  
18 The technique consists of inhibiting the auto-oxidation of pyrogallol in an  
19 aqueous medium. The oxidation was measured in spectrophotometer  $\lambda=420\text{nm}$   
20 at 37°C. The results were expressed in USOD/g protein, considering that one  
21 SOD unit is able to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol.

22 The catalase enzyme activity was determined based on the methodology  
23 developed by Aebi (1984) and modified by Panis et al., in 2013. The principle of  
24 the technique is based on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase,  
25 observed in spectrophotometry at 240nm. Results were expressed as the  
26 absorbance degradation rate per gram of protein.

27 The lipid peroxidation was evaluated by tert-butyl hydroperoxide-induced  
28 chemiluminescence. Erythrocytes were diluted in ice-cold 10mM monobasic  
29 phosphate buffer, pH 7.4 (Na 0.9%). The reaction was started with the addition  
30 of tert-butyl hydroperoxide and the curve was obtained in a GloMax  
31 luminometer after 60 minutes. The velocity of the peak (RLU/mg protein.mg<sup>-1</sup>)  
32 and the area under the curve (AUC) were analyzed.

33 Using the methodology developed by Tietze, 1968, the levels of total  
34 glutathione (TG) were determined. The quantification of total glutathione is

1 based on the conversion of GSSG present in the medium into GSH by the  
2 action of the NADPH-dependent glutathione reductase enzyme. The converted  
3 GSH, present in plasma, reacts with DTNB (5-thionitrobenzoate) at 412nm.  
4 Thus, when glutathione reductase is added, only GSSG will be converted to  
5 GSH reacting with DTNB. Therefore, the difference between total glutathione  
6 and oxidized glutathione corresponds to reduced glutathione. Results were  
7 expressed in  $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein.

8

### 9 *Statistical analysis*

10

11 Statistical analysis was performed using Prism 9 software (GraphPad  
12 Software, San Diego, CA, USA). Continuous variables were described as  
13 means and their respective standard deviations (SD). Categorical variables  
14 were presented in number and their respective percentages and compared  
15 using Fisher's exact test. To verify the normality of the data, the Shapiro-Wilk  
16 test was used. For the analysis of parametric data, the one-way ANOVA test  
17 was used. The Kruskal-Wallis test was used for non-parametric data. For  
18 proportion analysis, the Z test was used. Values  $\leq 0.05$  were considered  
19 statistically relevant.

## 1           **Results**

2  
3           According to the results obtained in histopathology, the patients were  
4 divided into two groups: BENIGN (n=9) and HNSCC (n=31). The individuals  
5 distribution regarding gender were similar between the benign and HNSCC  
6 groups, the benign group consisted of 77.7% men and 22.3% women, while in  
7 the HNSCC group the percentage was 80.6% and 19.4%, respectively.  
8 Although, parameters of smoking, type 2 diabetes, history of cancer and others  
9 remained similar in both groups, the Alcohol consumption analysis  
10 demonstrated a “very frequent” consumption three times higher in HNSCC  
11 compared to the BENIGN group, even though it is not statistically relevant, it  
12 should be stated. Another parameter that should be mentioned is the frequency  
13 of oral hygiene, which is 5.5 more often (>3) in the group BENIGN as showed in  
14 table 1.

15           Benign changes were distributed based on the histopathological pattern.  
16 Considering that head and neck neoplasms affect different anatomical sites, we  
17 classified them into three subgroups: papillomas, dysplasia and non-invasive  
18 neoplasia. Papillomatous lesions and non-invasive neoplasia accounted for (4)  
19 44.4% each. Dysplasia was observed in (1) 11.2%. All these data are presented  
20 in table 2.

21           Malignant lesions were distributed considering the histological  
22 differentiation degree. Poorly differentiated squamous cell carcinoma was  
23 observed in (5) 16.1%, while moderately differentiated squamous cell  
24 carcinoma was observed in (14) 45.2%, well-differentiated squamous cell  
25 carcinoma was found in (12) 38.7%.

26           Regarding the anatomical-topographic distribution of tumors, the main  
27 anatomical sites where benign and malignant lesions were found were: mouth  
28 floor, anterior commissure, gingiva, salivary gland, lip, larynx, tongue, mandible,  
29 oropharynx, hard palate, soft palate, sinuses and tonsil. Of the benign  
30 neoplasms, (1) 11.1% were in the floor of the mouth, (3) 33.4% in the larynx, (1)  
31 11.1% in the tongue, (1) 11.1% in the mandible, (2) 22.2% in the soft palate and  
32 (1) 11.1% sinuses. In the other sites, no signs indicative of benign neoplasia  
33 were found, as shown in table 4. In the HNSCC group, lesions on the oral floor  
34 were observed (2) 6.5%, anterior commissure (1) 3.2%, gum (1) 3.2%, salivary

1 gland (1) 3.2%, lip (3) 9.6%, larynx (7) 22.6%, tongue (4) 13.0%, mandible (1)  
2 3.2%, oropharynx (2) 6.5%, hard palate (1) 3.2%, sinuses (1) 3.2%, tonsil (1)  
3 3.2% and unknown site (6) 19.4%. Only in the soft palate was no malignant  
4 lesion found in our study population.

5

#### 6 *Oxidative stress parameters*

7

8 The results of enzymatic antioxidants are shown in figure 1. The SOD activity  
9 (fig. 1a) was higher in the BENIGN ( $p=0.0102$ ) and HNSCC ( $p<0.0001$ ) group  
10 compared to the control group. When the BENIGN group was compared with  
11 the HNSCC group, no statistically relevant differences were observed  
12 ( $p=0.2036$ ) (fig.1b). Catalase activity (Fig. 1c) was higher in the BENIGN  
13 ( $p<0.0001$ ) and HNSCC ( $p<0.0001$ ) group compared to the control. There was  
14 no difference between the BENIGN and HNSCC groups ( $p>0.9999$ ) (Fig. 1d).

15 GSH levels were shown in figure 2. The BENIGN group ( $p=0.2402$ ) did  
16 not present a statistically significant difference compared to the control group  
17 (Fig. 2a). However, the HNSCC group ( $p=0.0004$ ) showed reduced levels of this  
18 antioxidant compared to the control (Fig. 2a). When the BENIGN and HNSCC  
19 groups were compared with each other, no statistically relevant differences  
20 were observed ( $p=0.1645$ ) (Fig. 2b).

21 The results of membrane lipoperoxidation are shown in figures 3 and 4.  
22 The ascent rate of the curve (fig. 3a) was statistically lower in the BENIGN  
23 ( $p<0.0001$ ) and HNSCC ( $p<0.0001$ ) groups. No important differences were  
24 observed when the BENIGN and HNSCC groups were compared to each other  
25 ( $p=0.6262$ ) (Fig. 3b). The maximum emission peak was statistically lower in the  
26 BENIGN ( $p<0.0001$ ) and HNSCC ( $p<0.0001$ ) group compared to the control  
27 group (Fig. 3c). There was no statistical difference when the BENIGN and  
28 HNSCC groups were compared ( $p=0.1821$ ) (Fig. 3d). The area under the curve  
29 was statistically relevant in the BENIGN ( $p<0.0001$ ) and HNSCC ( $p<0.0001$ )  
30 groups when compared to the control group (Fig. 4a). The comparison of the  
31 BENIGN and HNSCC groups showed no difference ( $p=0.0687$ ) (Fig. 4b).

## 1           **Discussion**

2  
3           In most situations, the histological distinction between benign and  
4 malignant tumors is sufficient to characterize the neoplasm as benign or  
5 malignant. However, in certain situations, clinical and histological analysis is not  
6 able to elucidate the biology of the tumor, requiring the identification of  
7 molecular markers, such as oxidative stress, to help differentiate these tumors.  
8 Moreover, the characterization of the oxidative profile of patients with head and  
9 neck neoplasms is still not clear, so the extend of this comprehension could be  
10 a valuable tool to determine diagnosis as well as prognosis. In our study, we  
11 evaluated the antioxidant defense by SOD and CAT enzymes, blood lipid  
12 peroxidation as markers of oxidative stress to better characterize the tumor  
13 redox response.

14           Reactive species are constantly produced in various physiological and  
15 pathological processes. The SOD and CAT enzymes are responsible for  
16 neutralizing the superoxide anion and the hydrogen peroxide respectively.  
17 *Kudryavtseva et al., 2016* describes that superoxide anion and hydrogen  
18 peroxide are considered the main ROS. In order to minimize the damage  
19 induced by the superoxide anion, SOD is able to perform its dismutation to  
20 hydrogen peroxide, which although it is a non-radical reactive oxygen species,  
21 is less harmful than the superoxide anion. Subsequently, CAT converts  
22 hydrogen peroxide into water and oxygen (*SARDARO et al., 2019*). In our  
23 study, we observed an increase in SOD and CAT activity in the benign and  
24 HNSCC groups when compared to the control. *Bagul et al. 2013*, showed that  
25 the activity of antioxidant enzymes such as GPx and SOD were statistically  
26 increased in HNSCC patients due to tumor growth rate generating high levels of  
27 ROS and lipid peroxidation. Thus, to compensate for high free radical  
28 concentrations, SOD and CAT increase their activity as a natural defense  
29 mechanism against carcinogenesis. A study by *Yang, et al., 2002* evaluated the  
30 intensity of immunohistochemical staining for SOD2 enzyme in healthy and  
31 tumor tissue. The results obtained showed that SOD2 staining intensities were  
32 higher in HNSCC patients than in healthy tissue cells, reinforcing the hypothesis  
33 that the increase in the activity of antioxidant enzymes is due to the high rate of  
34 free radicals. Thus, *Liu et al., 2012* concluded that due to increased SOD

1 activity, tumors that present the high SOD expression phenotype will have a  
2 higher probability of metastasis due to SOD2-dependent hydrogen peroxide  
3 production, thus triggering the increase in expression of MMP family members,  
4 related to metastasis.

5 Glutathione plays an important role in a multitude of cellular processes,  
6 including differentiation, proliferation and apoptosis (TRAVERSO et al., 2013).  
7 Disorders in GSH are implicated in the development of several diseases,  
8 including cancer. Our results in the HNSCC group showed a lower  
9 concentration when compared to the benign and control group. *Shetty et al.,*  
10 *2014* report that a possible reason for the decreased levels of GSH is the  
11 depletion of these antioxidants due to the imbalance of free radicals and  
12 antioxidants in the redox balance during the process of carcinogenesis.  
13 *Khurshid et al., 2018* show that reduced levels of glutathione in the blood of  
14 HNSCC patients can deregulate cytochrome P450, altering the expression of  
15 glutathione, which are important mechanisms involved in carcinogenesis and  
16 mutagenesis.

17 As the main component of cell membranes, lipids play an indispensable  
18 role in maintaining cell integrity (BERZOSA et al., 2011). The cell membrane  
19 plays important roles in maintaining cell homeostasis, such as transporting  
20 nutrients, excreting toxic components, communicating and signaling with other  
21 cells (SIMONS, SAMPAIO, 2011). Membrane lipoperoxidation is defined as a  
22 process by which ROS oxidize lipids present in the plasma membrane, causing  
23 its destruction and loss of membrane architecture with consequent loss of the  
24 functions performed by it (JAKOVČEVIĆ et al., 2020). Our results showed that  
25 the benign group as well as the HNSCC group has a reduced capacity to  
26 contain lipoperoxidation. A study by *Marakala, et al., 2012*, evaluated levels of  
27 antioxidants such as vitamins A and C and related them to lipoperoxidation  
28 markers such as Malondialdehyde (MDA). They noted that MDA was  
29 associated with decreased antioxidant vitamins such as vitamin A and C  
30 reported in various pathological conditions including in patients with oral cavity  
31 and oropharyngeal cancer. *Malathi et al., 2011* report that this is especially  
32 important, because reduced levels of antioxidant predispose cells to OS so that  
33 the lipoperoxidation process occurs more quickly. Blood analysis of antioxidants  
34 and lipid peroxidation markers suggest the existence of an imbalance between

1 the antioxidant defense system and oxidant agents in patients with benign and  
2 malignant head and neck cancer compared to healthy individuals. However,  
3 more study should better characterize the oxidative stress parameters of  
4 patients with head and neck cancer, to use it as a toll as diagnostic and  
5 prognostic biomarker.

## 6 **Conclusion**

7 Based on the results presented in this study, GSH is decreased in head  
8 and neck cancer patients when compared to control, which corrobotates with  
9 the pathophysiology of many types of cancer. Moreover, this feature differs from  
10 benign group in not being different from the control. The characterization of  
11 oxidative stress parameters are important to differentiate benign and malignant  
12 neoplasms in terms of strategic in diagnosis and treatments.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

## References

- 1  
2
- 3 AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984.
- 4  
5 American Cancer Society. Guidelines for primary care providers. *CA Cancer*  
6 *Journal Clin.* 2019.
- 7  
8 ANDRADE, Jarielle Oliveira Mascarenhas; SANTOS, Carlos Antonio de Souza  
9 Teles; OLIVEIRA, Márcio Campos. Fatores associados ao câncer de boca: um  
10 estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista**  
11 **Brasileira de epidemiologia**, v. 18, p. 894-905, 2015.
- 12  
13 BAGUL K., Pankaj; K BANERJEE, Sanjay. Insulin resistance, oxidative stress  
14 and cardiovascular complications: role of sirtuins. **Current pharmaceutical**  
15 **design**, v. 19, n. 32, p. 5663-5677, 2013.
- 16  
17 BERZOSA, C. et al. Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic  
18 oxidative damage after acute physical exercise in humans. **European journal**  
19 **of applied physiology**, v. 111, n. 6, p. 1127-1133, 2011.
- 20  
21 BRASIL. Ministério da Saúde - INCA, Rio de Janeiro; 2020.
- 22  
23 DAHIYA, Kiran; DHANKHAR, Rakesh. Updated overview of current biomarkers  
24 in head and neck carcinoma. **World journal of methodology**, v. 6, n. 1, p. 77,  
25 2016.
- 26  
27 DHULL, Anil Kumar et al. Major risk factors in head and neck cancer: a  
28 retrospective analysis of 12-year experiences. **World journal of oncology**, v.  
29 9, n. 3, p. 80, 2018.
- 30  
31 GALBIATTI, Ana Livia Silva et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas,  
32 prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, p.  
33 239-247, 2013.
- 34  
35 GUENGERICH, F. Peter. Cytochrome P450 2E1 and its roles in  
36 disease. **Chemico-biological interactions**, v. 322, p. 109056, 2020.
- 37  
38 JAKOVČEVIĆ, Antonia et al. The Appearance of 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) in  
39 Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 868,  
40 2020.
- 41  
42 KHURSHID, Zohaib et al. Role of salivary biomarkers in oral cancer  
43 detection. **Advances in clinical chemistry**, v. 86, p. 23-70, 2018.
- 44  
45 KUDRYAVTSEVA, Anna V. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress  
46 in aging and cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 44879, 2016.
- 47 KUMAR, Vinay. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das**  
48 **doenças 8a edição**. Elsevier Brasil, 2010.
- 49

- 1 LEITE, Rafaella B. et al. The influence of tobacco and alcohol in oral cancer:  
2 literature review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.  
3 57, 2021.  
4
- 5 LIU, Zhonghua et al. Manganese superoxide dismutase induces migration and  
6 invasion of tongue squamous cell carcinoma via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent Snail  
7 signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 1, p. 44-50, 2012.  
8
- 9 MALATHI, M.; VIJAY, M.; SHIVASHANKARA, A. R. The role of oxidative stress  
10 and the effect of radiotherapy on the plasma oxidant-antioxidant status in head  
11 and neck cancer. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, v. 5, n. 2, p.  
12 249-251, 2011.  
13
- 14 MARAKALA, Vijaya; MALATHI, M.; SHIVASHANKARA, A. R. Lipid peroxidation  
15 and antioxidant vitamin status in oral cavity and oropharyngeal cancer  
16 patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 11, p. 5763-  
17 5765, 2012.  
18
- 19 RATNA, A., & MANDREKAR, P. Alcohol and cancer: Mechanisms and  
20 therapies. **Biomolecules**, v. 7, n. 3, p. 61, 2017.  
21
- 22 ROCHA, C. P.; CROCI, C. S.; CARIA, P. H. F. Is there relationship between  
23 temporomandibular disorders and head and cervical posture? A systematic  
24 review. **Journal of oral rehabilitation**, v. 40, n. 11, p. 875-881, 2013.  
25
- 26 SANTOS, Luiz Carlos Oliveira dos; DE MEDEIROS BATISTA, Olívio;  
27 CANGUSSU, Maria Cristina Teixeira. Characterization of oral cancer diagnostic  
28 delay in the state of Alagoas. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 76,  
29 n. 4, p. 416-422, 2010.  
30
- 31 SARDARO, Nicola et al. Oxidative stress and oral mucosal diseases: An  
32 overview. **in vivo**, v. 33, n. 2, p. 289-296, 2019.  
33
- 34 SENAPATI, Rashmirani; SENAPATI, Nihar Nalini; DWIBEDI, Bhagirathi.  
35 Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. **Infectious**  
36 **Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2016.  
37
- 38 SHETTY, Shishir Ram et al. Status of salivary lipid peroxidation in oral cancer  
39 and precancer. **Indian journal of medical and paediatric oncology: official**  
40 **journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology**, v. 35, n. 2, p.  
41 156, 2014.  
42
- 43 SIMONS, Kai; SAMPAIO, Julio L. Membrane organization and lipid rafts. **Cold**  
44 **Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 10, p. a004697, 2011.  
45
- 46 TRAVERSO, Nicola et al. Role of glutathione in cancer progression and  
47 chemoresistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.  
48

- 1 VIDAL, Laura; GILLISON, Maura L. Human papillomavirus in HNSCC:  
2 recognition of a distinct disease type. **Hematology/oncology clinics of North**  
3 **America**, v. 22, n. 6, p. 1125-1142, 2008.  
4
- 5 YANG, J. et al. Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and  
6 normal human oral epithelium. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31,  
7 n. 2, p. 71-77, 2002.  
8
- 9 ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to  
10 clinical application. **Nature reviews cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

**Table 1** – Clinical pathological and demographic characteristics of patients with head and neck disorders (n=40).

<b>Characteristics</b>	<b>BENIGN (n=9)</b>	<b>HNSSC (n=31)</b>	<b>p value</b>
<b>Sex</b>			0.645
Male (%)	7 <sup>a</sup> (77.7)	25 <sup>a</sup> (80.6)	
Female (%)	2 <sup>a</sup> (22.3)	6 <sup>a</sup> (19.4)	
<b>Age</b> Mean ± SD	57.67 ± 2.40	63.03 ± 2.13	0.202
<b>Smoking</b>			0.895
No (%)	1 <sup>a</sup> (18.2)	4 <sup>a</sup> (12.9)	
Yes (%)	6 <sup>a</sup> (54.5)	18 <sup>a</sup> (58.1)	
Ex-smoker (%)	2 <sup>a</sup> (27.3)	9 <sup>a</sup> (29)	
<b>Alcoholic</b>			0.451
Abstinent (%)	3 <sup>a</sup> (33.4)	10 <sup>a</sup> (32.3)	
Rarely (%)	2 <sup>a</sup> (22.2)	2 <sup>a</sup> (6.5)	
Casual (%)	2 <sup>a</sup> (22.2)	4 <sup>a</sup> (12.9)	
Frequent (%)	1 <sup>a</sup> (11.1)	4 <sup>a</sup> (12.9)	
Very Frequent (%)	1 <sup>a</sup> (11.1)	11 <sup>a</sup> (35.4)	
<b>Type 2 Diabetes</b>			1.000
No (%)	8 <sup>a</sup> (88.8)	27 <sup>a</sup> (87.1)	
Yes (%)	1 <sup>a</sup> (11.2)	4 <sup>a</sup> (12.9)	
<b>Hypertension</b>			0.697
No (%)	7 <sup>a</sup> (77.7)	21 <sup>a</sup> (67.7)	
Yes (%)	2 <sup>a</sup> (22.3)	10 <sup>a</sup> (32.3)	
<b>History of cancer</b>			0.213
No (%)	7 <sup>a</sup> (88.8)	29 <sup>a</sup> (93.5)	
Yes (%)	2 <sup>a</sup> (11.2)	2 <sup>a</sup> (6.5)	
<b>Family history of cancer</b>			0.707
No (%)	3 <sup>a</sup> (33.3)	15 <sup>a</sup> (48.4)	
Yes (%)	6 <sup>a</sup> (66.7)	16 <sup>a</sup> (51.6)	
<b>HPV</b>			0.121
Unkown (%)	7 <sup>a</sup> (88.8)	30 <sup>a</sup> (96.8)	
Know (%)	2 <sup>a</sup> (11.2)	1 <sup>a</sup> (3.2)	
<b>HPV Vaccine</b>			NA
No (%)	9 <sup>a</sup> (100)	31 <sup>a</sup> (100)	
Yes (%)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)	
<b>Frequency of oral hygiene</b>			0.142
0	0 <sup>a</sup> (0)	9 <sup>a</sup> (29)	
1-3	8 <sup>a</sup> (81.8)	21 <sup>a</sup> (67.7)	
>3	1 <sup>a</sup> (18.2)	1 <sup>a</sup> (3.3)	

BENIGN: Benign head and neck disorders; HNSCC: Head and neck squamous cell cancer; HPV: Human Papilloma Virus; Categorical data are presented as number and percentage, and continuous as mean standard deviation. Different letters show distribution in different portions and equal letters do not show differences in proportion. It was considered statistically significant  $p < 0,05$ .

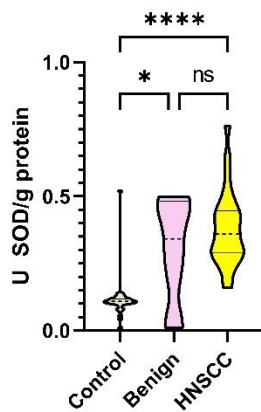
**Table 2** – Main benign histological changes found in patients with head and neck injuries (n=9).

<b>Anatomopathological Result</b>	<b>BENIGN (n=9)</b>
Papillomas (%)	4 (44.4)
Dysplasia (%)	1 (11.2)
Non-Invasive Neoplasia (%)	4 (44.4)

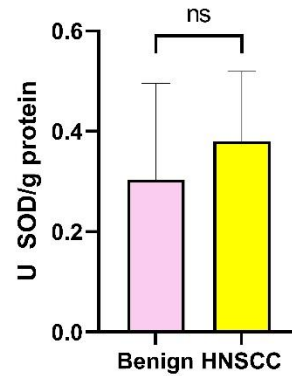
BENIGN: Benign head and neck disorders. Categorical data are presented as number and percentage.

Figure 1

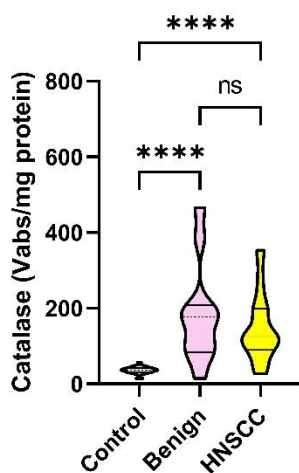
a)



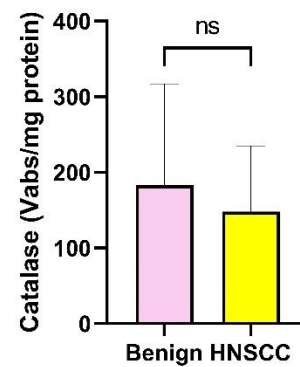
b)



c)

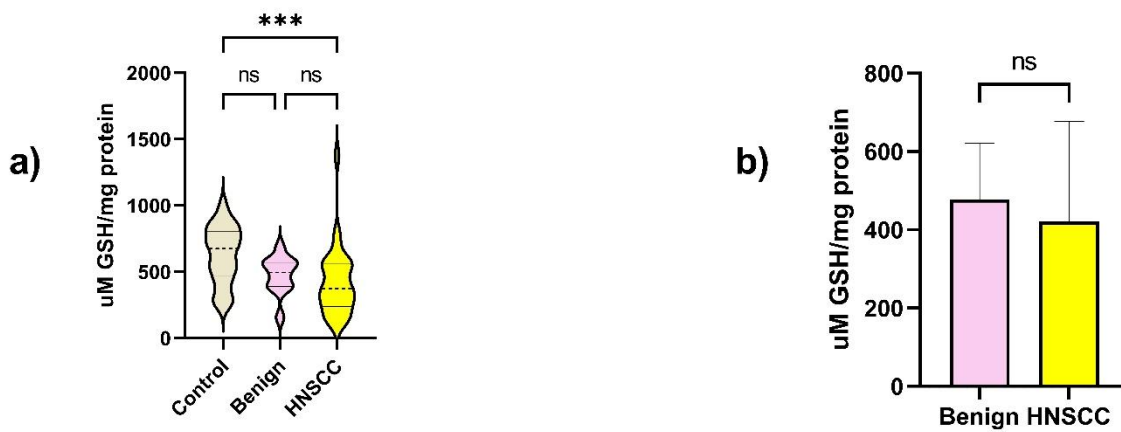


d)



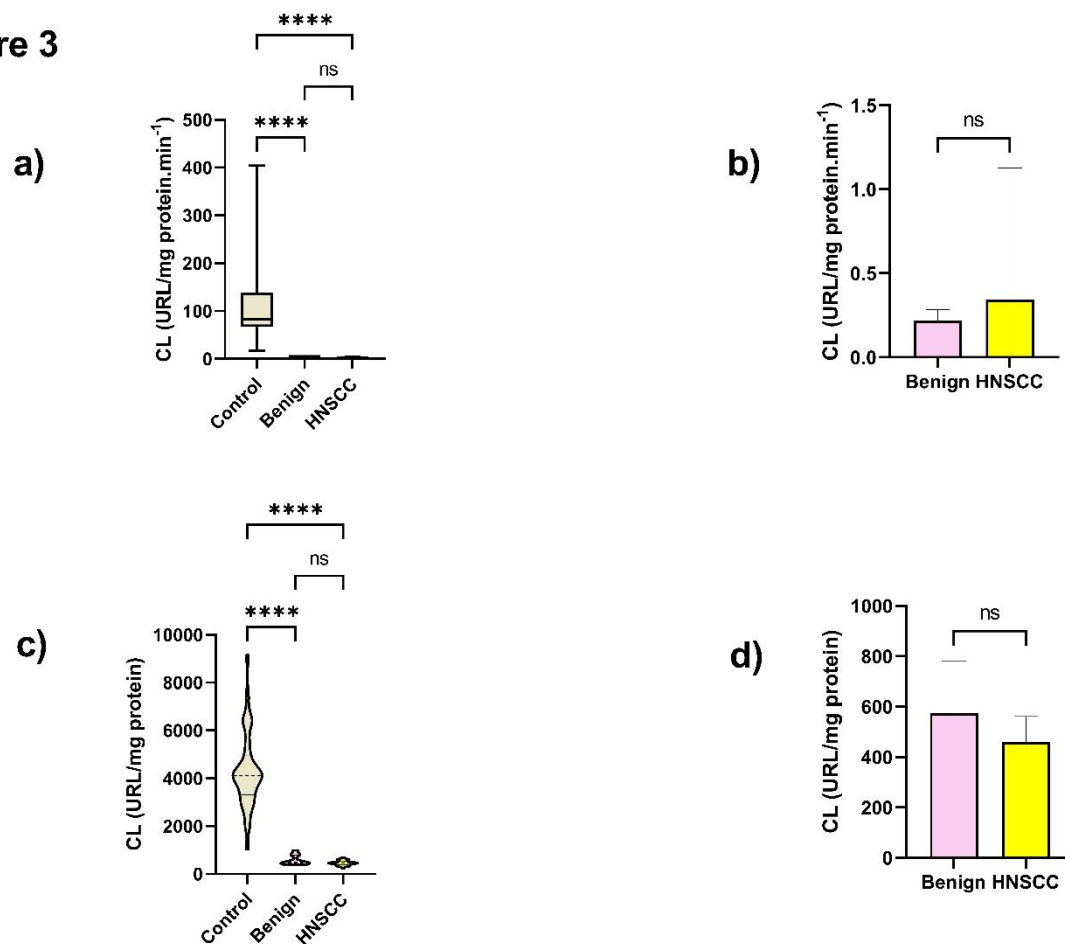
**Figure 1 - Systemic oxidative stress parameters in erythrocytes.** (a) superoxide dismutase (SOD) activity; (b) comparison of SOD activity in BENIGN and HNSCC tumors; (c) catalase enzyme activity; (d) comparison of catalase enzyme activity in BENIGN and HNSCC tumors. HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Cancer; ns: not significant; \* indicates significant difference ( $p < 0.005$ ).

Figure 2



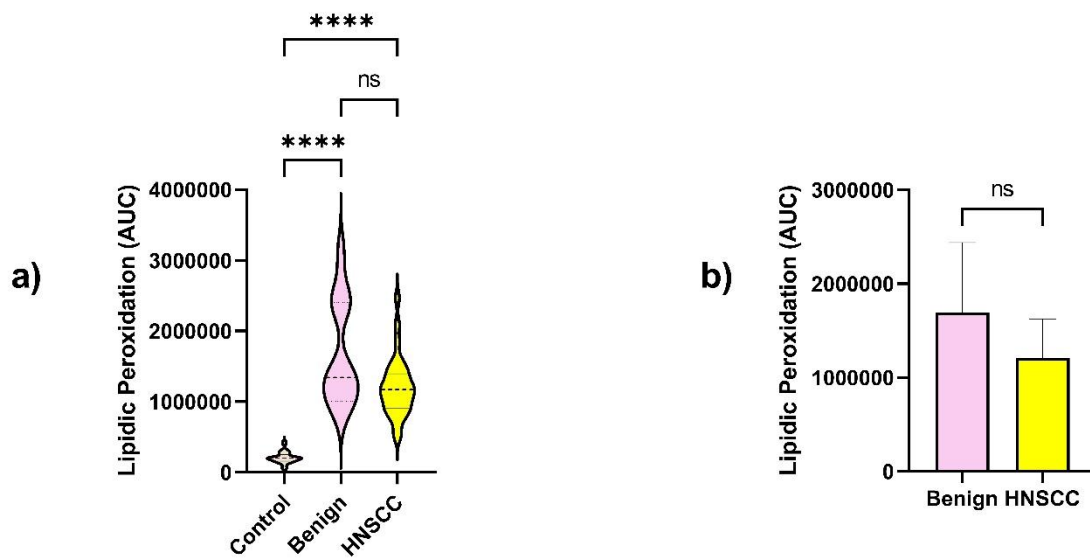
**Figure 2 - Systemic oxidative stress parameters in erythrocytes.** (a) levels of reduced glutathione (GSH) (b) comparison of reduced glutathione in BENIGN and HNSCC tumors. HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Cancer; ns: not significant; \* indicates significant difference ( $p < 0.005$ ).

Figure 3



**Figure 3 - Lipid peroxidation markers.** (a) speed of ascent of the curve of lipid peroxidation in erythrocytes (b) comparison of speed of ascent of the curve in BENIGN and HNSCC tumors. (c) maximum emission peak (d) comparison of maximum emission peak in BENIGN and HNSCC tumors. HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Cancer; ns: not significant; \* indicates significant difference ( $p < 0.005$ ).

Figure 4



**Figure 4 - Lipid peroxidation markers.** (a) the area under the curve of lipid peroxidation in erythrocytes (b) comparison of area under the curve in BENIGN and HNSCC tumors. Head and Neck Scamous Cell Cancer; ns: not significant; \* indicates significant difference ( $p < 0.005$ ).