

**Anelise Russo**

**Expressão de genes da família CYP450 e  
outras oxigenases em câncer de cavidade oral**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Doutor no  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
da Saúde, Eixo temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eny Maria Goloni-Bertollo

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Matos Biselli  
Chicote

São José do Rio Preto

2015

Russo, Anelise

“Expressão de genes da família CYP450 e outras oxigenases em câncer de cavidade oral”.

São José do Rio Preto, 2015.

102 p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Expressão gênica; 2. Xenobióticos; 3. Câncer de cavidade oral; 4. Citocromo P-450; 5. Oxigenases.

Anelise Russo

**EXPRESSÃO DE GENES DA FAMÍLIA  
CYP450 E OUTRAS OXIGENASES EM  
CÂNCER DE CAVIDADE ORAL**

**BANCA EXAMINADORA  
TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR**

**Presidente e Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria  
Goloni Bertollo

**1<sup>a</sup>.Examinadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Livia Silva Galbiatti

**2<sup>a</sup>.Examinadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna Victorasso Jardim  
Perassi

**3<sup>a</sup>.Examinadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Elizabete Silva

**4<sup>a</sup>.Examinadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Maria Rebolho  
Batista Arantes

**Suplentes:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorotéia Rossi da Silva Souza

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda da Silva Manoel Caetano

São José do Rio Preto, 23/11/2015.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	01
2. Casuística e Métodos.....	09
2.1. Caracterização da amostra.....	10
2.2. Caracterização dos aspectos clínicos.....	12
2.3. Análise Molecular.....	14
2.3.1. Extração de RNA total.....	14
2.3.2. Purificação das amostras de RNA total com <i>mirVana</i> <sup>TM</sup> <i>PARIS</i> <sup>TM</sup> <i>Kit</i> .....	16
2.3.3. Quantificação das amostras de RNA por espectrofotometria.....	16
2.3.4. Extração de DNA genômico.....	18
2.3.5. Quantificação das amostras de DNA por espectrofotometria.....	19
2.3.6. Detecção do <i>Human papillomavirus</i> – <i>HPV</i> .....	21
2.3.7. Transcrição reversa e síntese de DNA complementar (DNAc).....	25

2.3.8. Análise do kit <i>TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases</i> (Applied Biosystems) por Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq).....	25
I. Genes de referência.....	27
II. Cálculo de eficiência por meio da curva padrão.....	28
III. Quantificação da expressão gênica por meio do kit comercial <i>TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases, Fast 96-well Plate</i> (Applied Biosystems).....	31
2.4. Análise de dados.....	34
2.5. Análise estatística.....	34
2.6. Análise de bioinformática dos genes diferencialmente expressos.....	35
3. Resultados.....	37
4. Discussão.....	59
5. Conclusões.....	75
6. Referências Bibliográficas.....	77
7. Anexos.....	95
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	96
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	97
Anexo 3. Questionário.....	98
Material Suplementar.....	99

## ***Dedicatória***

### ***Aos meus pais Valmir e Angela***

*Por estarem sempre ao meu lado a cada passo de minha vida, ensinando a transformar uma dificuldade que aparece em meu caminho em sabedoria para a próxima. Além de ensinar a valorizar as alegrias que surgiram em minha vida. E acima de tudo me ensinaram que ter honestidade e humildade é uma virtude. Agradeço a vocês por existirem e por acreditarem no investimento de meus ideais. Dedico a vocês o meu amor incondicional!*

### ***À minha irmã Ariane***

*Pela amizade eterna e verdadeira, disposta a me ouvir com paciência e compreensão em qualquer momento sem se importar com o assunto, aconselhando-me nas decisões mais importantes. Afinal amiga é para essas coisas. Amo você!*

### ***Ao meu namorado Adriano***

*Por fazer parte da minha vida e ser meu ponto de equilíbrio, sempre disposto para me ouvir e ajudar fazendo parte dos momentos de alegria e de aflição. Pelo companheirismo, seu amor e dedicação.*

### ***Aos meus avós, tios e primos***

*Por acreditar no meu potencial e incentivar meus estudos para um dia poder chegar onde sonhei. Obrigada por nos momentos de incerteza, cansaço, alegrias, conseguiram se manter simplesmente presente.*

### ***Aos amigos***

*Pela amizade sincera, com lealdade e confiança que me proporcionam, me aceitando do jeito que sou com meus defeitos e minhas qualidades. Obrigada por preservarem nossa amizade.*

## ***Agradecimentos***

### ***À Deus***

*Pela benção de ter minha família ao meu lado, por reservar pessoas especiais para passar pela minha vida, pela proteção diária e por me confortar nos momentos de aflição.*

### ***Ao Diretor Geral Prof. Dr. Dulcimar Donizeti de Souza***

*Pela direção da instituição com grande maestria incentivando as pesquisas para contribuir no desenvolvimento e fortalecimento desta Instituição.*

### ***Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e seus funcionários***

*Pela disponibilidade e atenção durante o desenvolvimento deste estudo pelo curso de pós-graduação da Instituição.*

### ***À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo***

*Por me ensinar não só novos conhecimentos científicos para contribuir na minha formação como profissional, mas também novos conhecimentos para uma vida na minha formação como pessoa. Pela oportunidade de realizar este estudo em seu laboratório e por acreditar no meu potencial, assim como no meu sucesso.*

### ***À Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote***

*Pela co-orientação, nas práticas laboratoriais, nos relatórios e pela atenção, estando sempre disposta a ajudar, ensinar e corrigir contribuindo para a elaboração, o desenvolvimento e análises dos resultados deste estudo e em minha formação profissional.*

### ***À Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino***

*À Dra. Érika por toda paciência e contribuição no dia-dia laboratorial, no conhecimento científico e na dissertação de relatórios e artigos.*

***À Profa. Dra. Joice Matos Biselli Périco***

*Pela atenção, carinho, sugestões e por estar sempre disposta para ajudar durante o desenvolvimento do estudo e análises estatísticas de correção.*

***À s bolsistas técnicas no período de desenvolvimento deste estudo: Ana Paula, Tairine e Claudia.***

*Pela dedicação e atenção na rotina laboratorial, sempre prontas para me auxiliar, sem as quais não teria conseguido finalizar este trabalho a tempo.*

***A todos os colegas de pós-graduação da UPGEM.***

*Pela contribuição de todos que de alguma maneira no desenvolvimento do estudo estavam presentes e dispostos para ajudar. Em especial à Ana Lúvia, pelo conhecimento transmitido e cooperação mesmo quando estava distante. A Marcia, pela companhia nos procedimentos práticos, nas análises estatísticas, nos cursos e na rotina diária do laboratório dentre outras colaborações. E ao André pela companhia e auxílios em alguns teste estatísticos.*

***Aos Funcionários da UPGEM***

*À Daniela pela paciência e ajuda tanto nos procedimentos práticos como nos relatórios financeiros. À Carol e ao Lennon por organizar e manter o funcionamento do laboratório, no qual esta pesquisa foi desenvolvida.*

***À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva***

*Obrigada Profa. Eloiza e sua equipe pela atenção e pela troca de conhecimentos.*

***À Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas***

*Agradeço Profa. Heloisa e equipe pela colaboração para o uso de equipamentos do laboratório.*

***Ao Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto***

*Aos médicos, residentes e enfermeiras pela colaboração na obtenção das amostras e pela paciência colaborando com este trabalho.*

***Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Base de São José do Rio Preto***

*Ao médico Prof. Dr. Dalisio, a Dinha sua secretária e seus funcionários pela colaboração paciência e na microdissecção das amostras.*

***Aos pacientes do ambulatório***

*Por consentirem em participar da pesquisa e acreditar que a pesquisa é importante e poderá num futuro próximo desvendar os caminhos para melhorar o tratamento e quem sabe um dia, a cura de doenças.*

***Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo***

*Ao Dr. José Eduardo Levi, que gentilmente ofereceu sua colaboração para realização da detecção de HPV16 e HPV18 em seu laboratório. Às suas alunas: Cristiane Centrone que nos recebeu com muito carinho, atenção, gentileza e desenvolveu as atividades práticas realizadas no laboratório, e Cristina Mendes de Oliveira pela atenção na verificação das análises. E aos funcionários e alunos do Instituto pela atenção.*

***À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)***

*Pela bolsa concedida.*

***À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)***

*Pelo auxílio financeiro para compra do material necessário para realização desta pesquisa.*

***Aos membros da banca examinadora:***

*Pela disponibilidade e sugestões construtivas colaborando na correção da dissertação.*

***À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.***

*Epígrafe*

*“Eu agradeço todas as dificuldades que enfrentei.*

*Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.*

*As facilidades nos impedem de caminhar.*

*Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas.....	6
<b>Figura 2.</b> Fluxograma de trabalho do presente estudo.....	10
<b>Figura 3.</b> Análise molecular de DNA genômico.....	21
<b>Figura 4.</b> Detecção da região E7 do HPV 16.....	24
<b>Figura 5.</b> Detecção da região E7 do HPV 18.....	24
<b>Figura 6.</b> A. Curva de amplificação dos genes de referência <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i> . B. Curva padrão dos genes de referência <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> A. Composição do kit <i>TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases</i> B. Mapa dos ensaios.....	32
<b>Figura 8.</b> Genes de referência.....	33
<b>Figura 9.</b> Expressão dos genes em tumores de cavidade oral em relação aos tecidos não tumorais analisados por <i>One Sample T Test</i> (média com desvio padrão).....	41
<b>Figura 10.</b> Expressão dos genes em tumores de cavidade oral em relação aos tecidos não tumorais analisados por <i>Wilcoxon signed rank test</i> (mediana com variação interquartil).....	41
<b>Figura 11.</b> Metabolismo dos xenobióticos por meio das enzimas CYP450.....	45
<b>Figura 12.</b> Via os carcinógenos químicos.....	47
<b>Figura 13.</b> Metabolismo de drogas por meio das enzimas CYP450.....	49
<b>Figura 14.</b> Sinapse serotoninérgica.....	50
<b>Figura 15.</b> Metabolismo do ácido araquidônico.....	51

---

<b>Figura 16.</b> Via de regulação do mediador inflamatório dos canais de <i>Transient Receptor Potential</i> (TRP).....	52
<b>Figura 17.</b> Via de sinalização do receptor ativado por proliferador peroxissomal (PPAR).....	53
<b>Figura 18.</b> Via de biossíntese de esteroides.....	54
<b>Figura 19.</b> Via da biossíntese de hormônio esteroide.....	55
<b>Figura 20.</b> Via da biossíntese do ácido biliar primário.....	56
<b>Figura 21.</b> Metabolismo do ácido linoleico.....	57
<b>Figura 22.</b> Metabolismo dos aminoácidos glicina, serina e treonina.....	58

## Lista de Tabelas e Quadros

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos dados demográficos e fatores de risco das amostras coletadas de pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral.....	12
<b>Tabela 2.</b> Grupamento de TNM por estadio de acordo com Manual de Oncologia 3ª ed., 2008, UICC 7ª ed., 2009 e AJCC 7ª ed., 2009.....	13
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das amostras de carcinoma do tipo espinocelular de cavidade oral em relação ao TNM (categoria T, N e M).....	14
<b>Tabela 4.</b> Quantificação das amostras de RNA total purificadas com os valores de concentração e as razões de pureza das amostras incluídas no estudo.....	18
<b>Tabela 5.</b> Quantificação das amostras de, DNA genômico com os valores de concentração e as razões de pureza das amostras incluídas no estudo.....	20
<b>Tabela 6.</b> Distribuição da diluição seriada da amostra teste e as respectivas médias dos valores brutos de Cq obtido na curva padrão com <i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i> .....	31
<b>Tabela 7.</b> Análise estatística realizada com dados paramétricos por <i>One Sample T Test</i> .....	38
<b>Tabela 8.</b> Análise estatística realizada com dados não paramétricos por <i>Wilcoxon Signed Rank Test</i> .....	38
<b>Tabela 9.</b> Genes diferencialmente expressos em carcinoma espinocelular de cavidade oral.....	40
<b>Quadro 1.</b> As vias metabólicas dos seres humanos relacionadas aos 10 genes diferenciamente expressos.....	43

## Lista de abreviaturas e símbolos

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
18S	<i>RNA, 18S Ribosomal</i>
AA	Ácido Araquidônico ( <i>Arachidonic Acid</i> )
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AJCCC	<i>American Joint Committee for Cancer</i>
ALOX	Araquidonato 12- Lipoxigenase ( <i>Arachidonate 12-Lipoxygenase</i> )
BIREME	Biblioteca Regional de Medicina
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior
CDCA	Ácidos quenodeoxicólicos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX	Ciclooxigenases
Cq	Ciclo de Quantificação
CYPs	Citocromo P450 ( <i>Cytocrome P450</i> )
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico

---

DNAc	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EET	Ácidos Epoxieicosatrienóicos
EpOME	Ácido epoxioctadecanoico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto ( <i>São José do Rio Preto Medical School</i> )
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GP-Ps	Glicoproteínas-P ( <i>P-glycoproteins</i> )
GSTs	Glutathione-S-Transferases ( <i>Glutathione-S-transferases</i> )
GUSB	<i>Glucuronidase, Beta</i>
H-EETA	Hidroxi-ácidos epoxieicosatrienoicos
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HEPTE	Ácidos Hidroxiperoxieicosatetraenicos
HETE	Ácidos Hidroxieicosatetraenicos
HNC	<i>Head and neck cancer</i>
HPAs	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>

---

HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer ( <i>Brazilian National Cancer Institute</i> )
INCT-HPV	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus do HPV
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LILACS	<i>Latin American and Caribbean Health Sciences</i>
MAOB	Monoaminoxidase B ( <i>Monoamine Oxidase B</i> )
MDR	<i>Multiple Drus Resistence</i>
mEH	Epóxide Hidrolase Microssomal ( <i>Microsomal epoxide hydrolases</i> )
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MGB	<i>Minor-Groove Binding</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NaOH	Hidróxido de Sódio
NATs	N-acetiltransferases ( <i>N-acetyltransferases</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
ng	Nanograma
NGF	Fatores de crescimento neural

---

NLM	<i>National Library of Medicine</i>
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OATs	Transportadores Ânion Orgânico
OCTs	Transportadores Cátion Orgânico
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRq	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
PEG2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma
PTGIS	Prostaglandina I2 (Prostaciclina) Sintase ( <i>Prostaglandin I2 (Prostacyclin) Synthase</i> )
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
RefSeq	Banco de Dados de Sequências de Referência
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RQ	<i>Relative Quantitation</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

---

STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins Information</i>
THETA	Ácido trihidroxieicosatrienoico
TNF - $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor - alfa</i>
TNM	Tamanho do tumor; Comprometimento de linfonodos; Metástase a distância
TRP	<i>Transient Receptor Potencial</i>
TRPM8	<i>Transient Receptor Potencial Melastatin</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potencial Vanilloid</i>
UGTs	UDP-glucoroniltransferases
UICC	<i>International Union of Cancer Control</i>
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## RESUMO

**Introdução:** A suscetibilidade aos agentes ambientais e seus efeitos adversos à saúde dependem do perfil genético individual. Alguns indivíduos podem apresentar risco aumentado de desenvolver o câncer devido às diferenças no biometabolismo. Alterações no mecanismo de biotransformação de compostos endógenos e exógenos por reações de oxidação podem estar relacionadas com o processo de tumorigênese. Expressão diferencial de genes envolvidos nesse metabolismo de xenobióticos, tais como, os membros da família do citocromo P450 (CYP) e outras oxigenases, podem alterar o processo de ativação de agentes tóxicos e levar ao desenvolvimento do tumor de cavidade oral. Desse modo, as diferenças individuais de expressão gênica desta via associadas ao tabagismo e etilismo podem apresentar-se como significativo fator de risco para neoplasias. **Objetivo:** Identificar o padrão de expressão de genes envolvidos no mecanismo de biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos em tumores de cavidade oral, visando identificar biomarcadores de suscetibilidade para este tipo de câncer. **Casuística e Métodos:** Foram analisadas oito amostras de tecido de pacientes com diagnóstico patológico de carcinoma espinocelular de cavidade oral e oito amostras de tecidos não-tumorais adjacentes. A expressão de 92 genes da família CYP450 e outras oxigenases foi quantificada por reações em duplicata de PCRq em tempo real por meio do ensaio *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases 96-well fast plate (Applied Biosystems)*. Para análise estatística, foi realizado teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*, seguido dos testes *One-sample T test* (dados com distribuição normal) e *Wilcoxon signed rank test* (dados que não apresentaram distribuição normal) no programa *GraphPad Prism v.5*. A correção para múltiplos testes de *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate* foi aplicada para corrigir

falsos positivos. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para compreender as funções do sistema biológico e associar os genes diferencialmente expressos com vias metabólicas específicas. **Resultados:** Dentre os 96 genes investigados envolvidos no mecanismo de biotransformação (excetuando-se os quatro genes de referência), 12 genes apresentaram expressão diferencial em tecido de carcinoma do tipo escamoso de cavidade oral, comparado ao tecido não-tumoral ( $P < 0,05$ ). Somente o gene *CYP27B1* apresentou expressão aumentada nos tumores, enquanto os genes *CYP27A1*, *CYP2E1*, *CYP2R1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *CYP4F12*, *CYP4X1*, *PTGIS*, *ALOX12*, *CYP4B1* e *MAOB* apresentaram expressão reduzida. Após a correção para múltiplos testes, apenas o gene *PTGIS* apresentou expressão diferencial nos tumores. Após o levantamento de bioinformática, foram observadas cinco proteínas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, associado com processos inflamatórios importantes na carcinogênese (*CYP2E1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *ALOX12* e *PTGIS*). **Conclusão:** Genes que participam de reações de oxidação de carcinógenos apresentam expressão diferencial em tumores de cavidade oral. Enzimas codificadas por esses genes possuem papel importante no metabolismo do ácido araquidônico, única via relacionada à enzima *PTGIS*, significativa após análise de correção estatística. O ácido araquidônico e/ou os metabólitos provenientes desta via podem modular outros metabolismos, nos quais essas enzimas atuam e podem influenciar a regulação de mecanismos fisiológicos importantes no processo de tumorigênese.

**Palavras chave:** Expressão Gênica, Xenobióticos, Câncer de Cavidade Oral, Citocromo P-450, Oxigenases.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Susceptibility to environmental agents as well as its adverse effects health depend on the personal genetic profile. Some individuals can present increased risk to develop cancer due to differences in biometabolism. Changes in the biotransformation mechanism of endogenous and exogenous compounds by oxidation reactions may be related to the tumorigenesis process. Differential expression of the genes involved in this xenobiotic metabolizing, such as cytochrome P450 (CYP) family members and others oxygenases, can change the activation process of toxic agents and lead to the oral cavity tumor development. Therefore, the individual differences of gene expression of this pathway associated to smoking and drinking can present significant risk factor for neoplasia. **Objective:** To identify the pattern of the gene expression involved in the biotransformation mechanism of endogenous and xenobiotic compounds in oral cavity tumors, aiming at identifying susceptibility biomarkers to this cancer type. **Methods:** Eight tissue samples of patients with oral cavity squamous cell carcinoma and eight adjacent non-tumor tissue samples were used. Expression of 92 genes CYP450 family and other oxygenases was quantified by duplicate reactions of real time qPCR using “TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases 96-well fast plate” (Applied Biosystems). For statistical analysis was performed D'Agostino & Pearson omnibus normality test, followed by One-sample T test (data that showed normal distribution), and Wilcoxon signed rank test (data that did not present normal distribution) using GraphPad Prism v.5 program. Correction for multiple testing of Benjamini-Hochberg False Discovery Rate was applied to correct false positives. Bioinformatics tool was used to understand the biological system functions and to associate the differential expressed genes with specific metabolic pathways. **Results:** Of the 96 investigated genes involved in biotransformation mechanism (excepting the four reference genes),

12 genes showed differential expression in carcinoma tissue of oral cavity squamous cell type compared to non-tumor tissue ( $p < 0.05$ ). Only *CYP27B1* gene presented increased expression in the oral cavity tumors, whereas *CYP27A1*, *CYP2E1*, *CYP2R1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *CYP4F12*, *CYP4X1*, *PTGIS*, *ALOX12*, *CYP4B1* and *MAOB* genes showed reduced expression. After correction by multiple tests, only *PTGIS* gene presented differential expression, with reduced expression. After data survey bioinformatics, five proteins were observed involved in the metabolism of arachidonic acid associated with important inflammatory processes in carcinogenesis (*CYP2E1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *ALOX12* and *PTGIS*). **Conclusion:** Genes involved in the carcinogens oxidation reactions showed differential expression in tumors of oral cavity. The enzymes encoded by these genes play an important role in the arachidonic acid metabolism, only pathway related to *PTGIS* enzyme, significant after analysis of statistical correction. The arachidonic acid and/or metabolites derived this pathway may modulate others metabolisms in which these enzymes are involved and can influence the regulation of important physiological mechanisms in tumorigenesis process.

**Key words:** Gene Expression, Xenobiotic, Mouth Neoplasms, Cytochrome P-450, Oxygenases.

## *1. INTRODUÇÃO*

---

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (HNC – “Head and neck cancer”) é um termo que engloba todas as neoplasias malignas localizadas na mucosa do trato aerodigestivo superior,<sup>(1)</sup> estendendo-se desde a borda vermelha dos lábios até a cartilagem cricóide, incluindo a cavidade oral, faringe e laringe.<sup>(2,3)</sup> Em relação à histologia, mais de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço são originados de células escamosas, denominados carcinoma de células escamosas (SCC – “Squamous cell carcinoma”).<sup>(1)</sup>

O HNC é o sétimo tipo mais comum dentre as neoplasias malignas em todo o mundo de acordo com o estudo recente de 2015,<sup>(4)</sup> sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade por câncer no mundo.<sup>(5)</sup> Sua etiologia não é ainda totalmente compreendida e o diagnóstico precoce deste tipo de tumor é difícil devido à falta de sintomas específicos nos estágios iniciais da doença.<sup>(6)</sup> Pacientes com esse tipo de câncer apresentam uma taxa de sobrevida de cinco anos, com falhas no tratamento e frequentes casos de recidiva / reincidência, o que indica um grave problema de saúde pública.<sup>(7,8)</sup>

O desenvolvimento do HNC é resultado da interação de fatores ambientais e da herança genética,<sup>(1,9-11)</sup> portanto, a etiologia é multifatorial.<sup>(5,12)</sup> Em relação aos fatores ambientais, os principais fatores incluem estilo de vida, hábitos tabagista e etilista, prática de exercícios físicos, atividade ocupacional, alimentação, higiene oral e infecções virais.<sup>(11,13-16)</sup>

Considerando a herança genética, a maior parte dos cânceres é de origem somática e apenas aproximadamente 5% a 10% são hereditários, provenientes de mutações na linhagem germinativa.<sup>(17-21)</sup> A identificação e análise dos genes

relacionados com a carcinogênese são imprescindíveis para a compreensão de suas bases moleculares.<sup>(14,21,22)</sup>

No mundo, aproximadamente 600.000 novos casos de HNC são diagnosticados a cada ano e o câncer oral compreende cerca de metade destes casos e é considerado o sítio mais representativo deste tipo de tumor.<sup>(4)</sup> Neste sítio anatômico de cavidade oral, a histologia é constituída na maioria dos casos por SCC.<sup>(16)</sup> Deste modo, carcinoma oral de células escamosas (OSCC - “*Oral squamous cell carcinoma*”) corresponde a 90% dos canceres orais malignos.<sup>(23)</sup>

No Brasil, foram estimados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014 e 2015, 15.290 casos novos de câncer de cavidade oral, representando o quinto tipo mais comum de câncer em homens com 11.280 novos casos. Em relação ao gênero feminino, foram estimados 4.010 casos novos.<sup>(5)</sup>

Em geral, HNC acomete três vezes mais o gênero masculino que o feminino.<sup>(24)</sup> Embora um aumento da incidência desse tipo de câncer entre as mulheres nas últimas décadas tenha sido observado, vários autores relatam que o gênero masculino continua o mais acometido por esse tipo de tumor.<sup>(5,25,26)</sup> Possivelmente, devido a maior exposição dos homens aos fatores de risco, como por exemplo, o hábito etilista. Estudo de Zuo e colaboradores revelou associação entre dois polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs) no cromossomo X com dependência de álcool em homens, os quais apresentam apenas uma cópia do cromossomo X.<sup>(27)</sup>

Durante a última década, a incidência de HNC aumentou em homens e mulheres mais jovens.<sup>(15)</sup> Esta mudança tem sido atribuída à prática de sexo oral, e ao aumento do número de parceiros sexuais, levando ao aumento da infecção pelo vírus papiloma humano (HPV).<sup>(15,28)</sup> Os sítios anatômicos mais acometidos pelo HPV são orofaringe

<sup>(15,29)</sup> e cavidade oral.<sup>(16,30,31)</sup> Outras infecções virais também podem contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia, como o vírus Epstein-Barr, especialmente em carcinoma de nasofaringe.<sup>(14)</sup>

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus do HPV – INCT-HPV, calcula-se que entre 10 e 50% das pessoas sexualmente ativas apresentam-se infectadas com pelo menos um tipo de HPV.<sup>(32)</sup> De modo que, há mais de 100 tipos de HPV, dentre esses, em torno de 40 são considerados de alto risco oncogênico, os quais estão associados a certos tumores da cavidade oral e orofaringe.<sup>(32)</sup>

Assim, a determinação do *status* de HPV é atualmente parte da avaliação de diagnóstico de rotina para o prognóstico.<sup>(14,15,32,33)</sup> Dentre os tipos de HPV, os tipos 16 e 18 apresentam oncogenes E6 e E7 e têm demonstrado diferenças clínicas relevantes no tratamento de câncer de cólon de útero,<sup>(33)</sup> e são os mais frequentes nesse tipo de câncer.<sup>(30,33)</sup> Dados semelhantes são encontrados para HNC, deste modo, testes para detectar a presença de HPV nesses pacientes, assim como esses tipos 16 e 18 são importantes.<sup>(32,33)</sup> Uma vez que as pessoas podem reduzir o risco de infecção por HPV associado ao HNC ao receber a série de vacinas contra HPV antes de se tornarem sexualmente ativos.<sup>(15,29)</sup>

Dados da literatura também mostram uma alta prevalência de câncer oral na população com idade avançada, o que pode estar relacionada a alterações do estresse oxidativo na saliva,<sup>(34)</sup> como redução do mecanismo antioxidante e aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>(35)</sup> e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que levam a danos no ácido desoxirribonucléico (DNA).<sup>(7,36,37)</sup> Essas alterações impedem o sistema antioxidativo da saliva de exercer sua função de proteção, permitindo que compostos

carcinogênicos provenientes do consumo do álcool e do cigarro atuem na cavidade oral.<sup>(34)</sup>

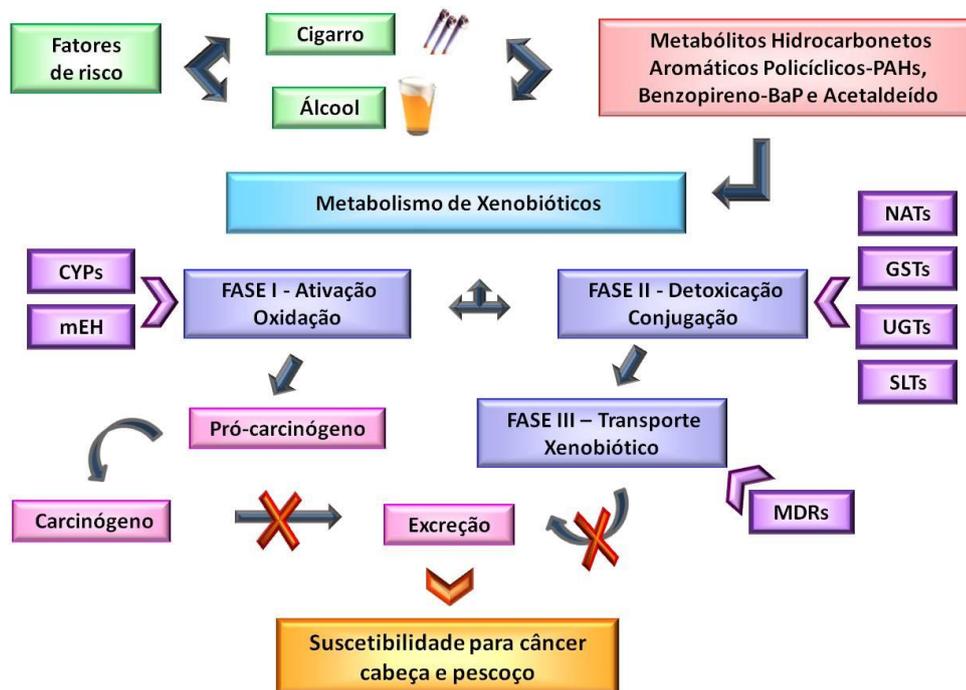
O cigarro e o álcool já são fatores etiológicos bem estabelecidos para HNC.<sup>(4,11,13,38)</sup> Compostos xenobióticos como N-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do cigarro,<sup>(39,40)</sup> e acetaldeído, metabólito primário do álcool,<sup>(41,42)</sup> ligam-se ao DNA, formando adutos estáveis. Genes que codificam enzimas envolvidas no mecanismo de ativação e posterior detoxificação desses compostos carcinogênicos podem apresentar polimorfismos genéticos<sup>(36,38,43-48)</sup> e alteração na sua expressão,<sup>(49)</sup> e conseqüentemente podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do câncer.<sup>(49,50)</sup>

O esquema da Figura 1, representa a maquinaria de metabolização xenobiótica que possui dois tipos principais de enzimas: as do metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I, e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Nesta maquinaria muitos compostos endógenos e xenobióticos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de Fase I que são, principalmente, enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs) e enzimas epóxide hidrolase microssomal (mEHs)<sup>(46,49,51,52)</sup> Desta forma, por meio da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno.<sup>(49)</sup>

Em contraponto, as reações da Fase II envolvem a conjugação com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases (UGTs) e N-acetiltransferases (NATs). Essas enzimas agem como inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção.<sup>(12,36,38,46,52)</sup>

A excreção de metabólitos para o controle homeostático de endobióticos e detoxificação de xenobióticos lipofílicos ocorre na Fase III.<sup>(53)</sup> As enzimas de Fase III são transportadores de membrana ativos, responsáveis pelo fluxo de compostos através das membranas celulares. Essas proteínas transportadoras de membranas são glicoproteína-P (GP-P),<sup>(54-56)</sup> incluindo os membros das famílias *ATP-binding cassette* (*ABC*), e da família *Solute carrier* (*SLC*).<sup>(53)</sup>

Além desses, outros transportadores de drogas e substâncias xenobióticas incluem os transportadores cátion orgânicos (OCTs) que excretam substâncias de carga elétrica positiva, e os transportadores ânion orgânicos (OATs), que excretam substâncias de carga elétrica negativa.<sup>(46,54-56)</sup> Transportadores de compostos que participam da fase III também podem participar na resistência de células tumorais a quimioterápicos, resultando no fenótipo conhecido como *Multiple Drug Resistance* (*MDR*).<sup>(55,56)</sup>



**Figura 1.** Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas – CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microsomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutathione-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucoroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases; “MDRs: Multiple Drug Resistences”.<sup>(46)</sup>

As enzimas CYP450 são monoxigenases funcionalmente relacionadas com outras oxigenases, como as monoamino oxigenases e família das lipoxigenases.<sup>(57,58)</sup> Além da participação na via de metabolização de xenobióticos, catalisam reações monoxigenases, nas quais um grupo hidroxil é adicionado também à proteína, lipídeo ou outro ligante. Membros desta família participam tanto da biossíntese como da degradação de esteroides, vitaminas, ácidos graxos, ácido araquidônico, prostaglandinas, aminas, feromônios e metabólitos vegetais.<sup>(49,58-60)</sup> Metabolizam ainda, inúmeras drogas e carcinógenos / mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais denominados, em seu conjunto, de xenobióticos.<sup>(12,61,62)</sup>

Assim, enzimas que atuam na via de biotransformação de xenobióticos podem participar de forma indireta do mecanismo de carcinogênese. Isso porque, desempenham função primordial na suscetibilidade individual à doença, uma vez que são responsáveis pela ativação e detoxificação destes compostos.<sup>(49,50)</sup> Por esta razão, vários estudos têm sido realizados para verificar a associação entre expressão de genes codificadores de tais enzimas e tumores de HNC<sup>(63)</sup> HNSCC<sup>(10,64)</sup> e OSCC.<sup>(65,66)</sup>

## **OBJETIVOS**

Considerando as evidências apresentadas, este estudo teve como objetivos:

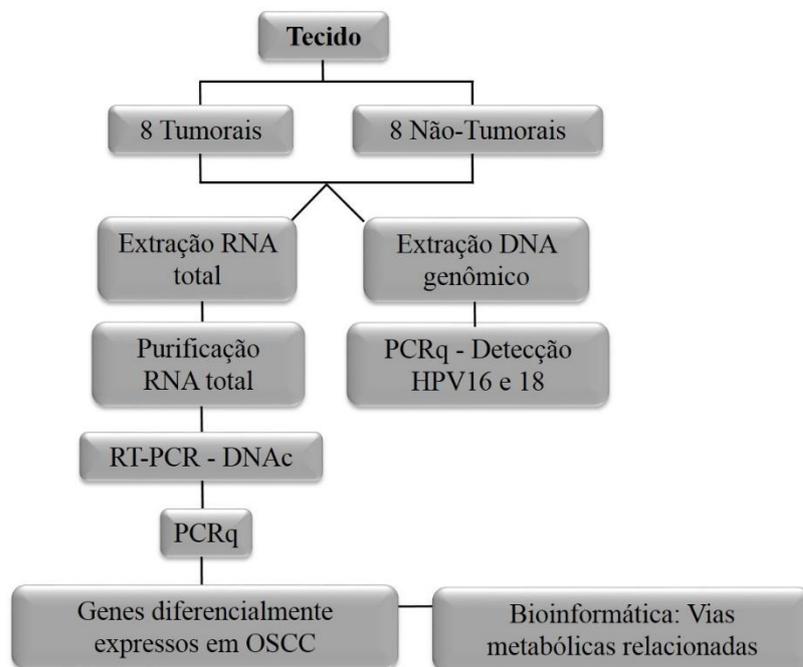
1. Investigar o padrão de expressão de genes que codificam enzimas CYP450 e outras oxigenases, envolvidas no mecanismo de biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos em carcinoma oral de células escamosas (OSCC - *Oral squamous cell carcinoma*) e comparar com tecidos não-tumorais adjacentes.
2. Identificar as vias metabólicas relacionadas aos genes diferencialmente expressos em OSCC. Possibilitando estabelecer a importância destes na carcinogênese de OSCC.

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2. 1. Caracterização das amostras

O presente estudo está de acordo com os regulamentos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP), parecer n.º 216.758. As atividades foram realizadas conforme apresentadas no fluxograma de trabalho (Figura 2).



**Figura 2.** Fluxograma de trabalho do presente estudo.

Após consentimento livre e esclarecido, independente do sexo, idade e cor de pele, foram coletadas 34 amostras de tecido tumoral e margem normal adjacente de pacientes procedentes do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base – Complexo FAMERP/FUNFARME, e armazenadas em freezer -80°C.

Após microdissecção pelo médico patologista, dentre as 34 amostras, 18 foram excluídas: 17 amostras pelo médico patologista após microdissecção, pois não foram classificadas como tecido tumoral de carcinoma espinocelular e tecido de epitélio normal, e uma de sítio anatômico primário de seios paranasais. Dentre as 16 amostras de carcinoma do tipo espinocelular de cabeça e pescoço confirmadas na microdissecção, o sítio anatômico primário mais frequente foi cavidade oral com 14 amostras, além de uma amostra de faringe e uma amostra de laringe.

Desta maneira, em busca de melhor associação da expressão diferencial dos genes presentes no kit comercial *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases, Fast 96-well Plate (Applied Biosystems)* e os tumores de cabeça e pescoço, apenas amostras do sítio anatômico primário de cavidade oral, foram selecionadas para o grupo amostral do estudo.

Os critérios de inclusão das amostras no estudo foram: confirmação patológica do tecido de tumor primário de carcinoma espinocelular de cavidade oral (OSCC) e tecido não-tumoral adjacente; diagnóstico negativo para o HPV tipos 16 e 18; concentração suficiente para quantificação da expressão gênica de oito amostras. E os critérios de exclusão foram: tumores provenientes de recidiva ou de pacientes tratados com radioterapia e/ou quimioterapia antes da cirurgia.

Dentre as 14 amostras de cavidade oral, duas amostras foram excluídas após o resultado positivo da detecção de HPV (será detalhado do item 2.3.6.) e oito amostras foram incluídas no estudo, conforme proposto inicialmente, de acordo com o rendimento da concentração de ácido ribonucléico (*Ribonucleic Acid - RNA*) total (após a extração e purificação) necessária para realização da expressão gênica em duplicata do *Array*. A Tabela 1 apresenta os dados sociodemográficos dos pacientes.

No estudo, foram considerados não fumantes os indivíduos que fumaram <100 cigarros na vida e etilista os indivíduos que consumiram mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor - 30mL; copo de vinho - 102mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja - 340mL).<sup>(67,68)</sup> Foi aplicado um questionário para coletar os dados demográficos dos pacientes e os dados clínicos foram adquiridos por prontuário médico dos pacientes.

**Tabela 1.** Distribuição dos dados demográficos e fatores de risco das amostras coletadas de pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral.

<b>Pacientes (N=08)</b>	
<b>Variáveis</b>	<b>N (%)</b>
<b>Idade (média ±DS)</b>	68,25 (±10,30)
<b>Gênero</b>	
Feminino	00 (0)
Masculino	08 (100)
<b>Tabagismo</b>	
Não	01 (12,5)
Sim	07 (87,5)
<b>Etilismo</b>	
Não	02 (25)
Sim	06 (75)

## 2. 2. Caracterização dos aspectos clínicos

Os tumores foram classificados pela equipe médica participante do projeto de acordo com os parâmetros do Manual de Oncologia, *Union International Control Cancer (UICC)* e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)* (Lessa et al., 2008;

Sobin et al 2009; AJCC, 2009)<sup>(69-71)</sup> três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M) (Tabela 2).

A classificação T foi dividida em tumores com pequena extensão (T1, T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). Os estádios foram divididos em precoce (estádios I e II) e categoria avançada da doença (III e IV)<sup>(69-71)</sup> (Tabela 2). O diagnóstico, sítio anatômico primário e a classificação do TNM e demais informações clínicas foram obtidas por meio de prontuário médico dos pacientes incluídos no estudo (Tabela 3).

**Tabela 2.** Grupamento de TNM por estádio de acordo com Manual de Oncologia 3<sup>a</sup> ed., 2008, UICC 7<sup>a</sup> ed., 2009 e AJCC 7<sup>a</sup> ed., 2009.<sup>(69-71)</sup>

Estádio	T	N	M
0	T <sub>is</sub>	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1-T3	N2	M0
	T4b	N0-2	M0
IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Tabela 3.** Distribuição das amostras de carcinoma do tipo espinocelular de cavidade oral em relação ao TNM (categorias T, N e M).

<b>Paciente</b>	<b>TNM</b>	<b>Estádio</b>
CCP11	T3N2cM <sub>x</sub>	IVA
CCP14	T1N0M <sub>x</sub>	I
CCP23	T4N1M0	IVA
CCP27	T2N3M0	IVB
CCP28	T2N0M0	II
CCP29	T1N0M0	I
CCP31	T3N2aM0	IVA
CCP33	T4N2M <sub>x</sub>	IVA

## 2. 3. Análise Molecular

### 2.3.1. Extração de RNA total

As amostras de tecido de OSCC e tecido não-tumoral adjacente foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido para transporte e posteriormente estocadas em freezer -80°C até o momento da extração.

O DNA genômico e o RNA total foram extraídos pela metodologia de extração sequencial por *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*). De acordo com o fabricante o *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*) foi produzido para isolar alta qualidade de RNA (assim como DNA e proteínas) a partir de células ou tecidos de amostras humanas. Este reagente é uma solução monofásica de fenol, isotiocianato de guanina e outros componentes que facilitam a isolamento de uma variedade de RNA de diferentes tamanhos moleculares. O *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*) mantém a integridade do RNA devido a alta eficiência

de inibição da atividade de RNases, enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares durante a homogeneização da amostra.

Para iniciar a técnica, foi realizada a homogeneização da amostra na proporção de 1mL do *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*) para 100mg de tecido da amostra por maceração manual com pistilo de porcelana e adição de nitrogênio líquido. O material foi transferido para microtubos de 1,5 mL e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foram adicionados de 200 µL de clorofórmio gerado para cada 1mL do *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*).

Esse material foi agitado por aproximadamente 15 segundos, mantido por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4°C, para separação das 3 fases: aquosa de coloração transparente com o RNA; interfase de coloração branca com o DNA; e orgânica de fenol-clorofórmio de coloração avermelhada com as proteínas.

A interfase e a fase orgânica foram armazenadas a 4°C para posterior isolamento do DNA genômico e das proteínas totais. Para precipitação do RNA total, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol para cada 1mL do *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*) utilizado. O microtubo foi incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%, agitado em vórtex e centrifugado a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado, o *pellet* de RNA foi secado por 10 minutos em temperatura ambiente para evaporação do álcool, ressuscendido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC)

(Ambion®) e incubado por 10 minutos à 55°C. As amostras de RNA total extraídas foram estocadas em freezer -80°C.

### **2.3.2. Purificação das amostras de RNA total com *mirVana*<sup>TM</sup> *PARIS*<sup>TM</sup> Kit**

O kit comercial *mirVana*<sup>TM</sup> *PARIS*<sup>TM</sup> Kit (*Applied Biosystems*), kit de extração de RNA e proteína totais, foi utilizado para purificar o RNA total extraído por *TRIzol*® Reagent (*Invitrogen*).

Conforme sugerido pela assistência científica técnica do fabricante do *TRIzol*® Reagent (*Invitrogen*) (indicado para extração sequencial de DNA, RNA e proteínas totais), dos kits comerciais *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*) (usado para a transcrição reversa do RNA total em DNAc, detalhado no item 2.3.7.) e *TaqMan*® Array Human CYP450 and other Oxygenases (*Applied Biosystems*), foi realizada a purificação a partir da etapa final do *mirVana*<sup>TM</sup> *PARIS*<sup>TM</sup> Kit (*Applied Biosystems*), iniciando na fase de precipitação do RNA total com etanol seguido pelas lavagens com os tampões e eluição final. Assim, o RNA total das amostras foi purificado para a realização da quantificação gênica com *TaqMan*® Array Human CYP450 and other Oxygenases (*Applied Biosystems*).

### **2.3.3. Quantificação das amostras de RNA por espectrofotometria**

As quantificações das amostras de RNA foram realizadas no espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*), e determinadas por sua absorvância em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm e 280 nm. Para a leitura da concentração, foi utilizado 1,0  $\mu$ L de amostra de RNA total e as concentrações foram determinadas em ng/ $\mu$ L.

O grau de pureza das amostras foi verificado por meio das razões 260/280 e 260/230, que indica a presença de proteínas, fenol, trizol ou outros contaminantes e compostos orgânicos utilizados no procedimento de extração das amostras. Deste modo, as razões 260/280 e 260/230 entre 1,7 - 2,1 e 1,8 - 2,2, respectivamente, segundo instruções do fabricante do equipamento *Nanodrop (Thermo Scientific)*, devem ser consideradas para as amostras livres de contaminantes nocivos à amplificação “*in vitro*”.

Os valores considerados aceitáveis para classificar as amostras como puras são próximo de 2, assim, no presente estudo, as amostras incluídas mostradas na Tabela 4 apresentaram os valores aceitáveis ente 1,9 - 2,3 para a razão 260/280. Embora que para a razão 260/230, um parâmetro secundário de pureza para ácido nucleicos, os valores entre 0,5- 1,9 foram obtidos mesmo após purificação do RNA total. Possivelmente, esses valores são explicados pelo uso do *TRIZOL*® *Reagent (Invitrogen)* solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanina que absorve a 260 nm.

No entanto, para garantir melhor qualidade das amostras de RNA para a quantificação de expressão gênica foi realizada purificação do RNA total. Além de não existir evidências de tal contaminação por reagentes químicos como possíveis inibidores na Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCRq) em tempo real, devido a eficiência do ensaio de curva padrão próxima de 100% de acordo com o fabricante dos reagentes utilizados na reação (*Applied Biosystems*).

**Tabela 4.** Quantificação das amostras de RNA total purificadas, os valores de concentração e as razões de pureza das amostras incluídas no estudo.

RNA	ng/uL	260/280	260/230
CCP 11	51,9	1,99	0,77
NCP 11	66,3	1,98	1,43
CCP14	155,90	2,00	1,99
NCP14	57,90	1,99	0,87
CCP23	212,8	2,05	1,38
NCP 23	221	2,30	1,69
CCP 27	244,2	2,08	1,19
NCP 27	138,5	2,03	0,68
CCP 28	140,7	2,04	1,08
NCP 28	49,4	2,07	0,56
CCP 29	31	1,91	1,37
NCP 29	42,6	1,95	0,84
CCP 31	69,3	2,06	1,08
NCP 31	45,8	2,11	0,72
CCP 33	164,5	2,08	1,84
NCP 33	36,6	2,11	0,52

#### 2.3.4. Extração de DNA genômico

A partir da interfase armazenada a 4°C foi realizado o isolamento do DNA genômico. A fase orgânica com as proteínas totais foi armazenada no banco de amostras. Inicialmente, foi adicionado 300 µL de etanol 100% para 1 mL de *TRIzol*® *Reagent (Invitrogen)* utilizado na homogeneização inicial. O tubo foi invertido várias vezes para homogeneizar, incubado por 3 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 2.000g por 5 minutos a 4°C.

A seguir, o sobrenadante de fase orgânica de fenol-etanol com as proteínas totais foi transferido para um novo tubo e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  como banco de amostras. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de solução com citrato de sódio/etanol (0,1 M de citrato de sódio em etanol 10%, pH 8,5) para cada 1 mL de *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*), incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, homogeneizado por inversão e centrifugado a 2.000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e descartado.

A seguir, foi adicionado 1,5 mL de etanol 75% ao *pellet* de DNA para cada 1 mL de *TRIzol*® *Reagent* (*Invitrogen*) utilizado, incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, homogeneizado por inversão, centrifugado a 2.000g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi removido e descartado. Deixou-se o *pellet* de DNA secar por 10 minutos, em seguida foi ressuspensionado em 300 $\mu\text{L}$  de NaOH 8mM. Para remover qualquer material insolúvel, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

O sobrenadante com o DNA foi transferido para um novo tubo, o pH foi ajustado para pH 7-8 com o tampão HEPES e 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi adicionado para conservação da molécula. O DNA extraído foi estocado a  $4^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.5. Quantificação das amostras de DNA por espectrofotometria**

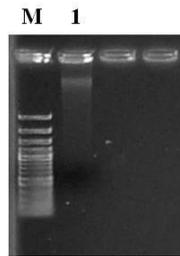
O espectrofotômetro *Picodrop*® UV-Visível (modelo *Pico200*) foi utilizado para quantificar o DNA genômico. Este equipamento abrange a faixa espectral de 220 a 950nm permitindo medidas de amostras de rotina nos laboratórios de Biociências como DNA, RNA, proteínas e microarrays com boa precisão e exatidão. Assim como espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*), utilizado para quantificar o

RNA, com o *Picodrop*® o grau de pureza do DNA das amostras também foi verificado por meio das razões 260/280 e 260/230.

No presente estudo, as amostras incluídas mostradas na Tabela 5 apresentaram valores entre os valores aceitáveis de 1,0 - 1,8 para a razão 260/280. Embora que para a razão 260/230, um parâmetro secundário de pureza para ácido nucleicos foram obtidos os valores entre 0,1- 1,2 (Tabela 5). Possivelmente, esses valores são explicados pelo uso do *TRIZOL*® *Reagent (Invitrogen)* solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanina que absorve a 260 nm. Para visualizar a qualidade do DNA foi realizada a eletroforese do DNA genômico (Figura 3).

**Tabela 5.** Quantificação das amostras de DNA genômico com os valores de concentração e as razões de pureza das amostras incluídas no estudo.

DNA	ng/μL	260/280	260/230
CCP 11	95	1,81	0,62
CCP 14	231	1,83	1,05
CCP 23	848	1,26	1,19
CCP 27	293,5	1,56	1,13
CCP 28	291,5	1,26	1,25
CCP 29	94,5	1,82	0,89
CCP 31	123,5	1,67	0,80
CCP 33	70	1,59	0,43



**Figura 3. Análise molecular de DNA genômico.** A imagem apresenta o gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pares de base (pb). Coluna 1: DNA de uma amostra teste.

### 2.3.6. Detecção do *Human papillomavirus* – HPV

Os oncogenes dos tipos HPV16 e HPV18 são os mais associados ao processo de carcinogênese e podem apresentar diferenças clínicas em HNC.<sup>(32,33)</sup> Deste modo, devido à impotência em realizar o diagnóstico desses dois tipos principais de HPV em pacientes com OSCC, a detecção de HPV16 e 18 foi incluída no presente estudo.

Inicialmente foram realizados testes para detecção de HPV16 e HPV18 por meio da metodologia de *Nested* PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com os primers consensos MY09/MY11 (5' – CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC – 3' / 5' – GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG – 3') e GP5+/GP6+ (5' – TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC – 3' / 5' – GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C – 3')<sup>(72)</sup> que amplificam as regiões conservadas do gene L1 do vírus HPV<sup>(73-76)</sup>. O DNA extraído da linhagem celular Hep2, a qual apresenta o DNA de HPV inserido no material genético da linhagem, foi utilizado como controle positivo da reação da PCR.<sup>(77,78)</sup>

No entanto, por tratar-se de um vírus, encontramos dificuldades na amplificação por PCR convencional da região conservada de identificação do vírus seguida de *Nested*

PCR das regiões específicas dos tipos 16 e 18 de HPV. Uma vez que o vírus HPV apresenta diversas variações conforme o tipo de HPV.<sup>(76)</sup>

Deste modo, os produtos da *Nested* PCR das amostras de tecido de carcinoma oral de células escamosas e do controle positivo da reação apresentadas, foram encaminhadas ao Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo – USP, para realização do sequenciamento com o objetivo de discriminar as amostras HPV-positivas daquelas HPV-negativas, para posterior realização da quantificação da expressão gênica.

Após o sequenciamento, observou-se uma sequência comum em todas as amostras, correspondente ao gene L1, uma sequência conservada do vírus HPV, após análise no *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Uma vez que havia possibilidade de contaminação do produto da *Nested* PCR, foi realizada uma visita técnica ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo (USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. José Eduardo Levi para treinamento técnico do método de detecção do HPV16 e HPV18 por PCR em tempo real. O Prof. Dr. José Eduardo Levi desenvolve em seu laboratório essa metodologia de detecção de HPV dos tipos 16 e 18 que apresentam oncogenes associados ao carcinoma de cavidade oral.<sup>(32,33)</sup>

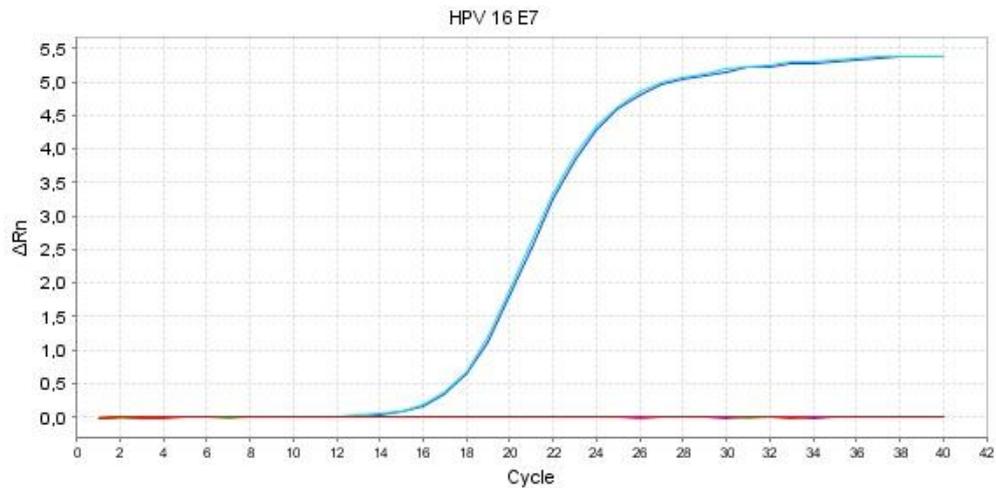
Foram utilizadas as sondas de HPV16 e HPV18 desenhadas pela equipe do Prof. Dr. José Eduardo Levi publicadas nos estudos de Oliveira et al., 2014<sup>(79)</sup> e Centrone et al., 2014<sup>(80)</sup> em forma de resumo no congresso *29th International Papillomavirus Conference and Public Health & Clinical Workshops* realizada em 21-25 de agosto de 2014 em Seattle, Washington, United States of America no *Washington State Convention Center*.

No protocolo utilizado pela equipe do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP, para detecção de HPV16 região E7, 250 ng de DNA foi amplificado no equipamento *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, com 1,25X de *TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)*, 10uM de primer sense e anti-sense e 200nM de sonda *TaqMan MGB 6-FAM (Applied Biosystems)*. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e, 50°C ou 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto.

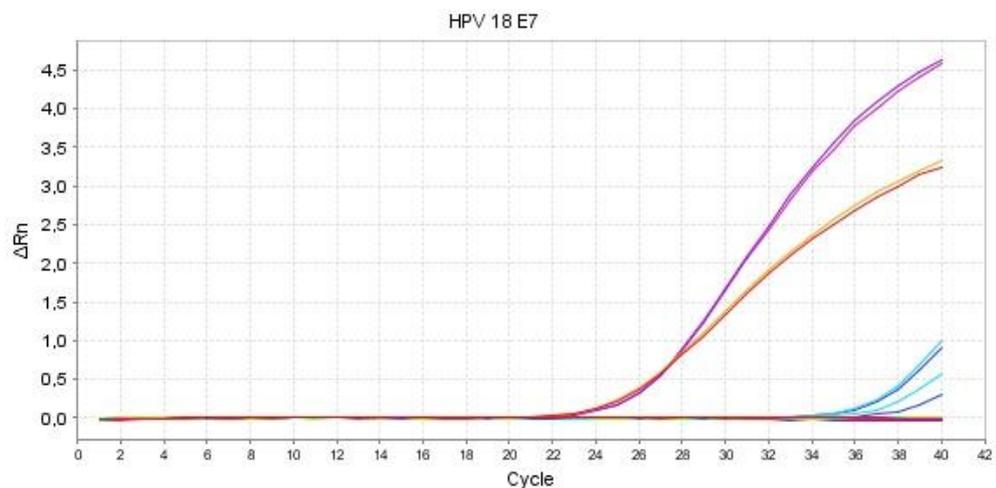
E para detecção de HPV18 região E7, 250 ng de DNA também foi amplificado no equipamento *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, com 1,25X de *TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)*, 10uM de primer sense e anti-sense, no entanto com 400nM de sonda *TaqMan MGB 6-VIC (Applied Biosystems)*. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e, 50°C ou 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto.

Em todas as reações de PCR em tempo real foram utilizados controles negativo (água) e positivo específicos para HPV16 (DNA extraído de células CasKi, positivo para HPV16) e HPV18 (DNA extraído de células HeLa e Hep2, positivo para HPV18). Todas as amostras e controles foram testados em duplicata.

Dentre as 14 amostras do sítio anatômico de cavidade oral, todas foram negativas para o HPV de tipo 16 (Figura 4) e apenas duas amostras foram positivas para o HPV 18 e excluídas do grupo amostral do presente estudo (Figura 5).



**Figura 4. Detecção da região E7 do HPV16.** Amplificação da réplica de DNA extraído de células CasKi utilizado como controle positivo da reação (azul claro/azul escuro).



**Figura 5. Detecção da região E7 do HPV18.** Amplificação das réplicas dos controles positivos da reação. DNA extraído de células HeLa (roxo/rosa) e DNA extraído de células Hep2 (bege/marrom). As linhas azuis representam as duas amostras (em duplicata) que apresentaram amplificação e consideradas positivas para HPV 18.

### **2.3.7. Transcrição reversa e síntese de DNA complementar (DNAc)**

As amostras de RNA total purificadas foram submetidas à transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*) para síntese de DNAc utilizando-se o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*.

Conforme instruções do fabricante (*Applied Biosystems*), em uma reação de 20  $\mu\text{L}$ , foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de *RT Random Primers 10x*, 0,8  $\mu\text{L}$  de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) Mix (100 mM) 25x, 1  $\mu\text{L}$  da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de Tampão 10x, 4,2  $\mu\text{L}$  água tratada com DEPC (*Ambion®*) e 2000 ng de RNA total em volume de 10  $\mu\text{L}$ . Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. As amostras de DNAc foram armazenadas a -20°C.

### **2.3.8. Análise do kit *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases (Applied Biosystems)* por Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCRq)**

Foi realizada a quantificação relativa por meio do experimento de PCR em tempo real, no qual a expressão do gene de interesse dos tecidos de carcinoma de cavidade oral das amostras foi comparado com a expressão do mesmo gene nos tecidos não-tumorais adjacentes dessas amostras. Os resultados são expressos como *fold change* (aumento ou diminuição) na expressão do tecido de tumor em relação ao tecido não-tumoral. Genes normalizadores, são usados como controle para a variabilidade experimental neste tipo de quantificação (ver detalhes no item I.).

De acordo com o fabricante *Applied Biosystems*, para as reações de PCRq foram utilizadas as sondas *TaqMan*® do tipo *minor-groove binding* (MGB) (*Applied Biosystems*), que contém um fluoróforo FAM ligada à extremidade 5' e uma molécula *quencher* (supressora) não fluorescente ligada à extremidade 3'. Na reação da PCR, as sondas *TaqMan*® MGB (*Applied Biosystems*) hibridizam-se especificamente à sua sequência complementar do gene de interesse entre os *primers* senso e anti-senso (oligonucleotídeos iniciadores).

Nos primeiros ciclos de PCR a sonda está intacta e devido a proximidade, a fluorescência do fluoróforo FAM é absorvida pela molécula *quencher* e apenas o sinal baixo é detectado. O sinal baixo dos primeiros ciclos, é automaticamente subtraído a zero pelo *software SDS 2.0* (*Applied Biosystems*), e é chamado de linha de base (*baseline*). Durante a reação, ocorre a amplificação da sequência de interesse e a DNA polimerase cliva as sondas e separa o fluoróforo da molécula *quencher*, ocorrendo a emissão da fluorescência.

No decorrer da reação ocorre o aumento do sinal de fluorescência de acordo com a quantidade de amplificações das sequências do gene alvo conforme sua expressão na amostra analisada. Assim, com o aumento do sinal de amplificação, o sinal de fluorescência torna-se visível e o sinal de amplificação que é inversamente proporcional à quantidade de destino inicial (*Applied Biosystems*).

A intensidade de fluorescência na reação foi determinada pelo cálculo do  $\Delta Rn$  ( $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ ), no qual  $Rn^+$  representa a intensidade de emissão do fluoróforo FAM/ intensidade de emissão do ROX em determinado momento; e  $Rn^-$  corresponde a intensidade de emissão do fluoróforo FAM/ intensidade de emissão do ROX antes da

amplificação. A fluorescência do fluoróforo ROX é emitida constantemente durante toda a reação, assim ROX é utilizado como controle interno passivo.<sup>(81,82)</sup>

Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de  $\Delta Rn$  permanecem no *baseline* (fluorescência do ROX > FAM). Na fase logarítmica, ocorre acúmulo de amplificação e  $\Delta Rn$  ultrapassa o *baseline*. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de  $\Delta Rn$ , correspondente a linha de corte (*threshold*) para a curva de amplificação de cada gene estudado. O número do ciclo em que o  $\Delta Rn$  cruza o *threshold* corresponde ao ciclo de quantificação (Cq) da amostra. O valor de Cq é preditivo da quantidade de RNA mensageiro – RNAm alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é a quantidade de RNAm presente. O cálculo de quantificação relativa foi feito pelo método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  descrito por Livak e Schmittgen, em 2001. Amostras de tecido não-tumoral foram utilizadas como calibrador.<sup>(81,82)</sup>

Os valores brutos de Cq foram calculados pelo programa SDS versão 2.0 (*Applied Biosystems*) após ajuste manual da *baseline* (sinal basal de fluorescência) e da *threshold* (linha de corte) para cada gene alvo analisado, realizados no programa *Expression Suite* versão 1.0.3. (*Applied Biosystems*).

### **I. Genes de referência**

É fundamental utilizar produtos de genes de controle interno da reação confiáveis para normalização dos níveis de expressão nos experimentos, deste modo, tipicamente produtos de expressão de genes *housekeeping* são usados. Usando um controle endógeno como referência (controle interno), uma quantificação de RNAm alvo pode ser normalizada para as diferenças na quantidade de RNA total adicionada a cada reação.

Comparações de expressão gênica relativa funcionam melhor quando o nível da expressão do gene de referência escolhido permanece constante. De acordo com o fabricante *Applied biosystems*, a escolha dos genes de referência foi revisada por artigos das revistas: *BioTechniques* 29:332 (2000) e *J Mol Endocrinol* 25:169 (2000).

No presente estudo foram utilizados como normalizadores os genes de referência: *RNA, 18S ribosomal - 18S, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – GAPDH, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 – HPRT1* e *Glucuronidase, Beta – GUSB* (incluídos no *array* investigado no estudo, detalhado na Figura 4).

## II. Cálculo de eficiência por meio da curva padrão

Uma série de diluições de concentrações conhecidas de uma amostra foi utilizada para realização de uma curva padrão com os genes de referência *GAPDH* e *HPRT1* para determinação da quantidade inicial de amostra a ser utilizada na reação de PCRq por meio do kit *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases (Applied Biosystems)* e para avaliação da eficiência da reação.

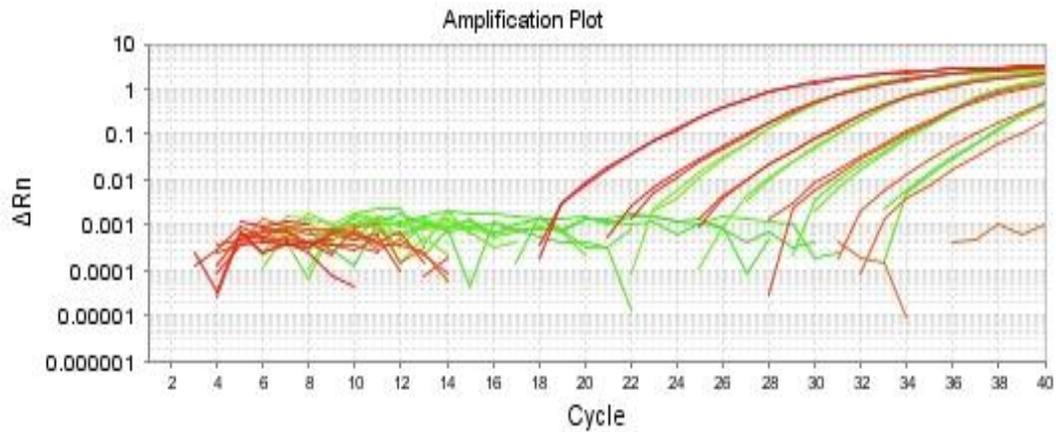
De acordo com o fabricante *Applied Biosystems*, as concentrações escolhidas para a curva padrão devem abranger o intervalo de concentração esperada do alvo nas amostras experimentais. Essa curva padrão fornece informações sobre a eficiência da reação, assim como, os parâmetros de *slope*, *y-intercept* e *correlation coefficient* da reação. O *Correlation coefficient* ( $R^2$ ) é uma medida que mostra se os dados estão ajustados na curva padrão. O valor de  $R^2$  reflete a linearidade da curva padrão. Idealmente,  $R^2 = 1$ , apesar de geralmente o valor de 0.999 ser o valor máximo. O *slope* da fase log-linear da reação de amplificação é uma medida para obter resultados precisos e reprodutíveis. As reações devem ter uma eficiência próxima de 100%, o

equivalente a um *slope* de -3,32. A eficiência é determinada pela equação: Eficiência =  $10^{(-1/\text{slope})-1}$ . Uma reação deve ter uma eficiência ideal entre 90% e 110%, o que corresponde a um *slope* de entre -3,58 e -3,10.

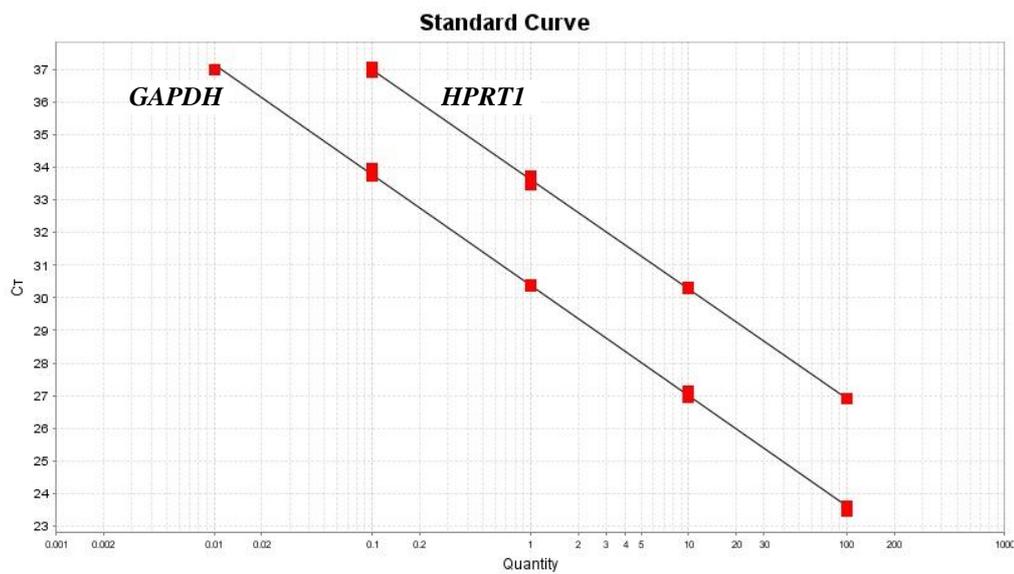
No presente estudo, para curva padrão foram realizadas quatro diluições seriadas da concentração de DNAc da amostra teste com fator de diluição 1:10, com início do DNAc em 100 ng e término em 0,01 ng. Assim, foram avaliadas 5 concentrações de DNAc: 100 ng; 10 ng; 1 ng; 0,1 ng; 0,01 ng. As reações foram realizadas em duplicata. De acordo com instruções do fabricante, em cada poço da placa foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de volume final de reação contendo: 1  $\mu\text{L}$  de DNAc e 8  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC (Ambion®), 1  $\mu\text{L}$  do ensaio 10X (*primers* e sonda) (Applied Biosystems) e 10  $\mu\text{L}$  de *TaqMan gene expression master mix 1X* (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a 50°C por 2 minutos, a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Estas reações foram realizadas no equipamento *StepOne Plus™* (Applied Biosystems).

Após a reação as médias dos valores brutos de Cq da amostra em duplicatas correspondente a cada diluição foram utilizadas no cálculo de eficiência, que resultou nos valores de *slope* = -3,38, *y-intercept* = 30,37,  $R^2 = 0,999$  eficiência = 97,42 para *GAPDH* e *slope* = -3,35, *y-intercept* = 33,63,  $R^2 = 1$  eficiência = 98,64 para *HPRT1*. O *Software SDS 2.0* apresentou gráfico (Figura 6) em escala logarítmica das diluições de concentrações conhecidas (eixo X) em relação aos valores da média de Cq das concentrações (eixo Y) para os genes *GAPDH* e *HPRT1* (Tabela 6).

### A. Curva de amplificação



### B. Curva padrão



**Figura 6. A. Curva de amplificação dos genes de referência *GAPDH* (vermelho) e *HPRT1* (verde). Amplificação de amostras para os dois controles endógenos selecionados. B. Curva padrão dos genes de referência *GAPDH* e *HPRT1*. Testes de Extensão Dinâmica. Eixo X – Ciclo de quantificação. Eixo Y – Quantidades das amostras.**

**Tabela 6.** Distribuição da diluição seriada da amostra teste e as respectivas médias dos valores brutos de Cq obtido na curva padrão com *GAPDH* e *HPRT1*.

Gene de referência	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>
Concentração da amostra teste	Média do valor de Cq	Média do valor de Cq
100 ng	21,81	25,06
10 ng	25,33	28,40
1 ng	28,74	31,67
0,1 ng	32,10	35,07
0,01 ng	36,18	Indeterminado**
Controle negativo*	Indeterminado**	Indeterminado**

\* Controle negativo da reação: sem a presença de DNAc

\*\*Indeterminado: Não houve amplificação do DNAc

### III. Quantificação da expressão gênica por meio do kit comercial *TaqMan*® *Array Human CYP450 and other Oxygenases, Fast 96-well Plate (Applied Biosystems)*

A quantificação da expressão de genes envolvidos no mecanismo de biotransformação de compostos endógenos e exógenos foi realizada em duplicata (duas placas por amostra) utilizando o kit comercial *TaqMan*® *Array Human CYP450 and other Oxygenases, Fast 96-well Plate (Applied Biosystems)* (Figura 7). O painel de ensaios desenhado pelo fabricante (*Applied Biosystems*) possibilitou a avaliação de quatro genes de referência (*18S*, *GAPDH*, *HPRT1* e *GUSB*) (Figura 8) como controles da reação de 92 ensaios para genes da família CYP450 e genes associados que incluiu genes de 56 membros da família CYP450, como a Citocromo oxidoreductase e a Citocromo b5 redutase. Membros da família Monoxigenase funcionalmente

relacionados também foram incluídos, como Monoamino oxigenase e famílias Lipoxigenases (*Applied Biosystems*).

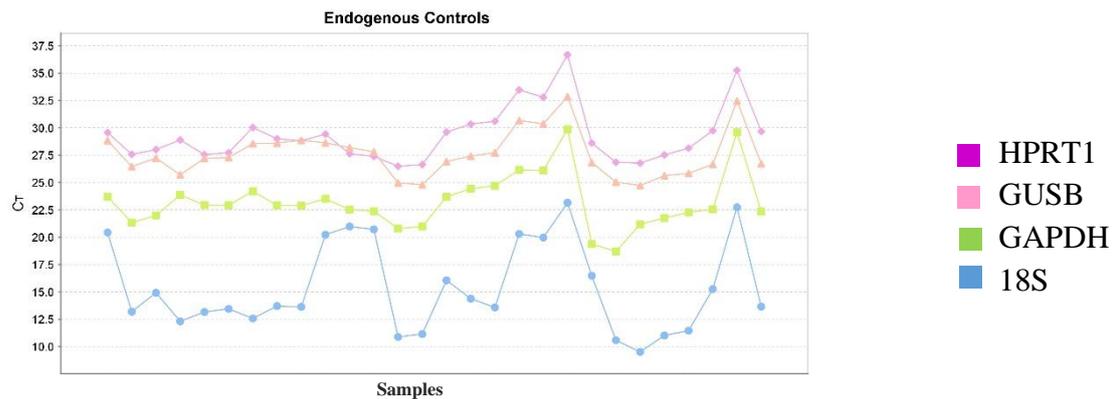
### A. Composição dos ensaios

<i>TaqMan® Array Plate</i>	
<b>Via</b>	<i>Homo sapiens: CYP450 + Oxigenases</i>
<b>Formato</b>	96 (TOTAL)
	92 (Genes: <i>CYP450</i> e outros <i>Oxigenases</i> )
	4 (Genes: controles endógenos)

### B. Mapa dos ensaios

Gene Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP11A1	CYP11B1	CYP11B2	CYP17A1	CYP19A1
B	CYP2A13	CYP2A6	CYP2A7	CYP2B6	CYP2C18	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6	CYP2E1	CYP2F1	CYP2J2
C	CYP2R1	CYP2S1	CYP2U1	CYP2W1	CYP3A4	CYP3A43	CYP3A5	CYP3A7	CYP4A11, CYP4A22	CYP4B1	CYP4F11	CYP4F12
D	CYP4F2	CYP4F22	CYP4F3	CYP4F8	CYP4V2	CYP4X1	CYP4Z1	CYP7A1	CYP7B1	CYP8B1	CYP20A1	CYP21A2
E	CYP24A1	CYP26A1	CYP26B1	CYP26C1	CYP27A1	CYP27B1	CYP27C1	CYP39A1	CYP46A1	CYP51A1	TBXAS1	PTGIS
F	ORC3L	CYB5A	CYB5B	CYB5R1	CYB5R2	CYB5R3	CYB5R4	FDX1	FDXR	FLAD1	NENF	PGRMC1
G	PGRMC2	BCMO1	DBH	DOHH	FMO1	FMO2	FMO3	FMO4	FMO5	KMO	PAH	PAM
H	SC4MOL	SQLE	TH	TPH1	TPH2	TYR	MAOA	MAOB	ALOXE3	ALOX5	ALOX12	ALOX15

**Figura 7. A. Composição do kit *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxigenases*.** Descrição dos números de ensaios avaliados, incluindo genes alvo e genes de referência como controle da reação, totalizando 96 ensaios. **B. Mapa dos ensaios.** Disposição dos ensaios na placa do *array*.



**Figura 8. Genes de referência.** Distribuição dos valores de Cq gerados para cada gene de referência nas amostras estudadas.

Os genes Citocromo P450 compõem uma ampla família de hemoproteínas que possui função na via de transporte de elétrons. As reações catalisadas pelos CYP450 mais comuns são as reações monoxigenases, nas quais um grupo hidroxil é adicionado à proteína, lipídeo ou outro ligante. Membros desta família são responsáveis pela maioria dos metabolismos de drogas e outras moléculas pequenas, assim desempenham papéis chave na biossíntese de esteroides (*Applied Biosystems*).

As reações, procedimentos de aplicação da amostra e selagem dos *arrays* foram realizadas de acordo com instruções do fabricante. As instruções foram de utilizar de 5 a 50 ng de DNAc em 10  $\mu$ L de reação. Assim, no estudo, foi realizada a quantificação do kit *TaqMan® Array Human CYP450 and other Oxygenases* (*Applied Biosystems*) adicionando em cada poço da placa 25ng de DNAc (0,25 $\mu$ L) com 4,75  $\mu$ L de água tratada com DEPC (*Ambion®*) (5 $\mu$ L de DNAc + água) e 5  $\mu$ L de *TaqMan® Master Mix Gene Expression* (*Applied Biosystems*). No equipamento *Step One Plus* (*Applied Biosystems*), em ciclagem *standard* as reações foram submetidas a 50°C por 2 minutos, a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O

gráfico da figura 5 mostra os valores de Cq gerados para cada gene de referência utilizado como normalizadores da reação nas amostras estudadas.

#### 2.4. Análise de dados

O valor do Cq igual a 40 foi utilizado como corte para indicar a detecção da expressão gênica. Assim, marcadores com  $Cq < 40$  foram considerados expressos, enquanto aqueles com  $Cq \geq 40$  foram considerados não expressos e não foram incluídos nas análises posteriores. Este valor de Cq considerado no presente estudo, foi definido de acordo com o padrão de expressão do nosso grupo amostral.

Para normalização dos dados, foi utilizada a média geométrica de múltiplos genes de referência conforme descrito por.<sup>(83)</sup> O cálculo da quantificação relativa foi realizado pelo método  $2^{-\Delta Cq}$ .<sup>(81,82,84)</sup>

$$2^{-\Delta Cq} = (Cq \text{ alvo} - Cq \text{ gene referência})_{\text{tumoral}} - (Cq \text{ alvo} - Cq \text{ gene referência})_{\text{não-tumoral}}$$

Nesse cálculo, o não tumoral foi utilizado como calibrador. Assim os dados de quantificação relativa (*Relative Quantitation* - RQ) do grupo caso foram apresentados em relação ao grupo controle. Para o grupo controle,  $\Delta Cq = 0$  e  $2^0 = 1$ , então o RQ do grupo controle foi igual a 1, por definição.<sup>(81,82,84)</sup>

#### 2.5. Análise estatística

Para análise estatística, primeiramente foi realizado teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* e os marcadores cujos valores de RQ apresentaram distribuição normal foram comparados ao RQ do grupo controle ( $RQ = 1$ ) pelo teste T para uma amostra (*One-sample T test*). Os marcadores cujos valores de RQ não apresentaram distribuição normal foram analisados por *Wilcoxon signed rank test*.

As comparações de RQ entre os grupos foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism v.5*. Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando o valor de p ajustado correspondente foi menor que 0,05. Ao final dos testes, foi aplicada a correção para múltiplos testes descrita por Benjamini e Hochberg (1995) (*Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*) para corrigir a ocorrência de falsos positivos.<sup>(85)</sup>

## 2.6. Análise de bioinformática dos genes diferencialmente expressos

As ferramentas de bioinformática *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG),<sup>(86)</sup> *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins Information* (STRING),<sup>(87)</sup> *National Center for Biotechnology* (NCBI)<sup>(88)</sup>, *GeneCards®: The Human Gene Database*<sup>(89)</sup> e *Descritores em Ciências da Saúde* (DeCS)<sup>(90)</sup> foram utilizadas para verificar as funções biológicas, bem como metabolismos em que as enzimas codificadas pelos genes diferencialmente expressos estão envolvidos.

KEGG é uma bases de dados usada como ferramenta para compreender funções do sistema biológico, tal como a célula, o organismo e o ecossistema, a partir da informação a nível molecular, em especial os conjuntos de dados moleculares em larga escala gerados por sequenciamento do genoma e outras tecnologias experimentais.<sup>(86)</sup>

STRING é um banco de dados de interações de proteínas conhecidas e preditas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivados de quatro fontes: contexto genômico, experimentos de alto rendimento, co-expressão (conservada) e conhecimento prévio.<sup>(87)</sup>

NCBI reúne várias base de dados sobre avanços da ciência e da saúde, fornecendo acesso à informação biomédica e genômica. O banco de dados sobre os *Gene* integra informações a partir de uma vasta gama de espécies. Um registro pode incluir

nomenclatura, sequências de referência (RefSeqs), mapas, percursos, variações, fenótipos, e links para genoma, fenótipo e locus-específico de todo o mundo. E o banco de dados *Protein* é uma coleção de sequências de várias fontes, incluindo traduções de regiões codificantes anotadas no GenBank, RefSeq e TPA, bem como registros de SwissProt, PIR, PRF, e PDB. As sequências das proteínas são os determinantes fundamentais da estrutura e função biológica.<sup>(88)</sup>

*GeneCards* é um banco de dados integrador que fornece informação facilmente acessível abrangendo todos os genes humanos anotados e preditos. Ele integra automaticamente os dados de > 100 fontes, incluindo genômica, transcriptômica, proteômica, genéticas, clínicas e informações funcionais.<sup>(89)</sup>

O vocabulário estruturado e trilingue DeCS - Descritores em Ciências da Saúde foi criado pela Biblioteca Regional de Medicina - BIREME para servir como uma linguagem única na indexação de artigos de revistas científicas, livros, anais de congressos, relatórios técnicos, e outros tipos de materiais, assim como para ser usado na pesquisa e recuperação de assuntos da literatura científica nas fontes de informação disponíveis na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) como Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS), MEDLINE e outras. Foi desenvolvido a partir do *Medical Subject Headings (MeSH)* da *U.S. National Library of Medicine (NLM)* com o objetivo de permitir o uso de terminologia comum para pesquisa em três idiomas, proporcionando um meio consistente e único para a recuperação da informação independentemente do idioma.<sup>(90)</sup>

### *3. RESULTADOS*

### 3. RESULTADOS

Após as análises estatísticas, dos 96 genes investigados envolvidos no mecanismo de biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos (excetuando-se os quatro genes de referência), 12 genes apresentaram expressão diferencial entre oito tecidos de carcinomas do tipo espinocelular de cavidade oral e os tecidos não-tumorais ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplos testes (Tabelas 7 e 8 e Material Suplementar 1).

**Tabela 7.** Análise estatística realizada com dados paramétricos por *One Sample T Test*.

	CYP27A1	CYP2E1	CYP2R1	CYP2J2	CYP2U1	CYP4F12	CYP4X1	PTGIS
<i>D'Agostino &amp; Pearson omnibus normality test</i>								
Valor de p	0,6205*	0,5868*	0,482*	0,1332*	0,334*	0,3473*	0,5246*	0,1336*
<i>One sample t test</i>								
Valor p (bicaudal)	<b>0,0064**</b>	<b>0,0091**</b>	<b>0,0276**</b>	<b>0,0009**</b>	<b>0,0425**</b>	<b>0,005**</b>	<b>0,0082**</b>	<b>0,001**</b>
Média RQ tumoral	0,4952	0,5111	0,5472	0,4178	0,6086	0,4057	0,4639	0,3479
Desvio Padrão	0,3721	0,387	0,4618	0,2963	0,4472	0,417	0,4158	0,3419

\* Valores de p não significantes resultante do teste de normalidade

\*\* Em negrito: os valores de p significantes

**Tabela 8.** Análise estatística realizada com dados não paramétricos por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

	ALOX12	CYP27B1	CYP4B1	MAOB
<i>D'Agostino &amp; Pearson omnibus normality test</i>				
Valor de p	< <b>0,0001*</b>	< <b>0,0001*</b>	<b>0,0122*</b>	<b>0,0001*</b>
<i>Wilcoxon Signed Rank Test</i>				
Valor p (bicaudal)	<b>0,0391**</b>	<b>0,0391**</b>	<b>0,0234**</b>	<b>0,0156**</b>
Mediana RQ tumoral	0,03578	1,927	0,08512	0,1882
Percentil 75%	0,2277	6,343	0,618	0,3693

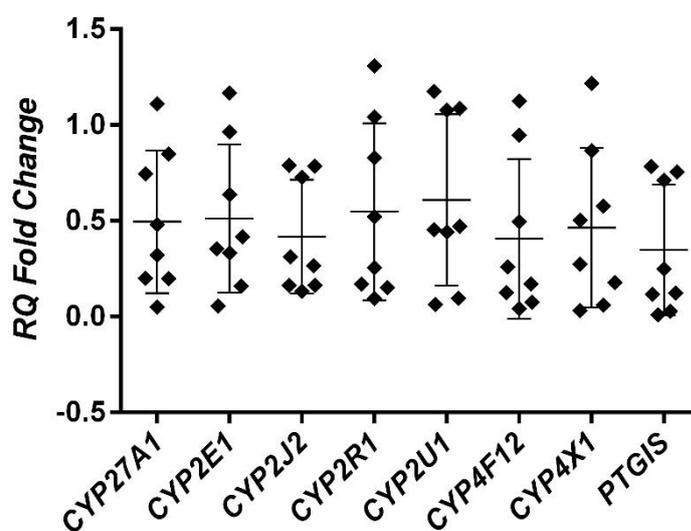
\* Valores de p significantes resultante do teste de normalidade

\*\* Em negrito: os valores de p significantes

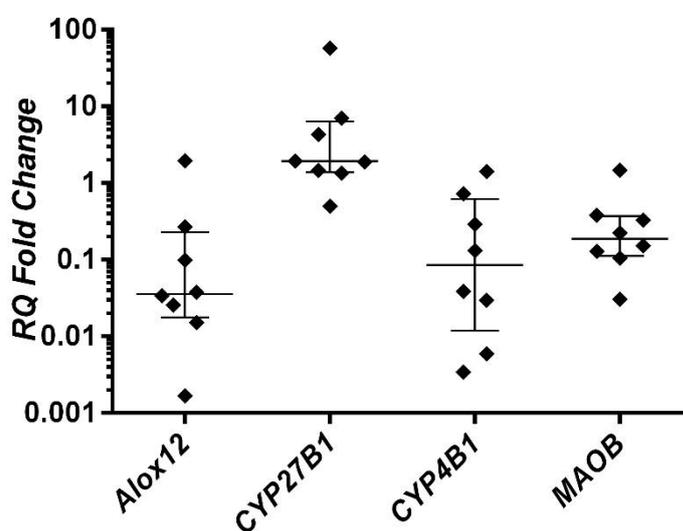
Entre os 12 genes diferencialmente expressos, somente o gene *CYP27B1* apresentou expressão aumentada nos tumores de OSCC, enquanto os genes *CYP27A1*, *CYP2E1*, *CYP2R1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *CYP4F12*, *CYP4X1*, *PTGIS*, *ALOX12*, *CYP4B1* e *MAOB* (Tabela 9) apresentaram expressão reduzida (Figuras 9 e 10). No entanto, apenas o *PTGIS* apresentou expressão diferencial após a correção para múltiplos testes, com expressão reduzida em tecido de OSCC.

**Tabela 9.** Genes diferencialmente expressos em carcinoma espinocelular de cavidade oral.

<b>Símbolo do gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Localização cromossômica</b>
<i>CYP2E1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily E, Polypeptide 1</i>	1571	10	10q26.3
<i>CYP2R1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily R, Polypeptide 1</i>	120227	11	11p15.2
<i>CYP2J2</i>	<i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily J, Polypeptide 2</i>	1573	1	1p31.2-p31.3
<i>CYP2U1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 2, Subfamily U, Polypeptide 1</i>	113612	4	4q25
<i>CYP4B1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 4, Subfamily B, Polypeptide 1</i>	1580	1	1p33
<i>CYP4F12</i>	<i>Cytochrome P450, Family 4, Subfamily F, Polypeptide 12</i>	66002	19	19p13.1
<i>CYP4X1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 4, Subfamily X, Polypeptide 1</i>	260293	1	1p33
<i>CYP27A1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 27, Subfamily A, Polypeptide 1</i>	1593	2	2q35
<i>CYP27B1</i>	<i>Cytochrome P450, Family 27, Subfamily B, Polypeptide 1</i>	1594	12	12q14.1
<i>PTGIS/ CYP8A1</i>	<i>Prostaglandin I2 (Prostacyclin) Synthase / Cytochrome P450, Family 8, Subfamily A, Polypeptide 1</i>	5740	20	20q13.13
<i>MAOB</i>	<i>Monoamine Oxidase B</i>	4129	X	Xp11.23
<i>ALOX12</i>	<i>Arachidonate 12-Lipoxygenase</i>	239	17	17p13.1



**Figura 9.** Expressão dos genes em tumores de cavidade oral em relação aos tecidos não tumorais analisados por *One Sample T Test* (média com desvio padrão). Os valores de RQ estão apresentados em escala linear.



**Figura 10.** Expressão dos genes em tumores de cavidade oral em relação aos tecidos não tumorais analisados por *Wilcoxon signed rank test* (mediana com variação interquartil). Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 10.

Após o levantamento de bioinformática dentre os genes 12 que apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa não foi possível encontrar associação entre as proteínas codificadas pelos genes *CYP4B1* e *CYP4F12* em funções biológicas dos seres humanos.<sup>(86)</sup>

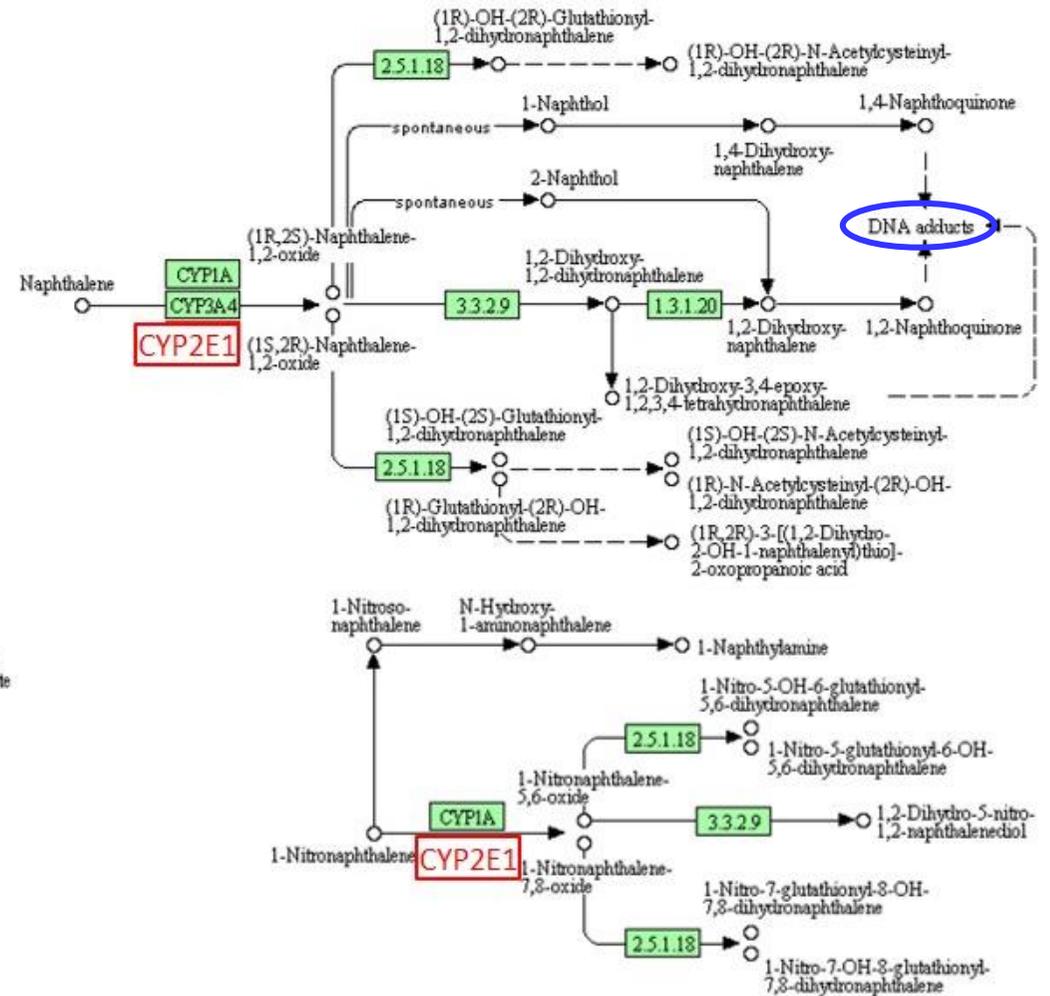
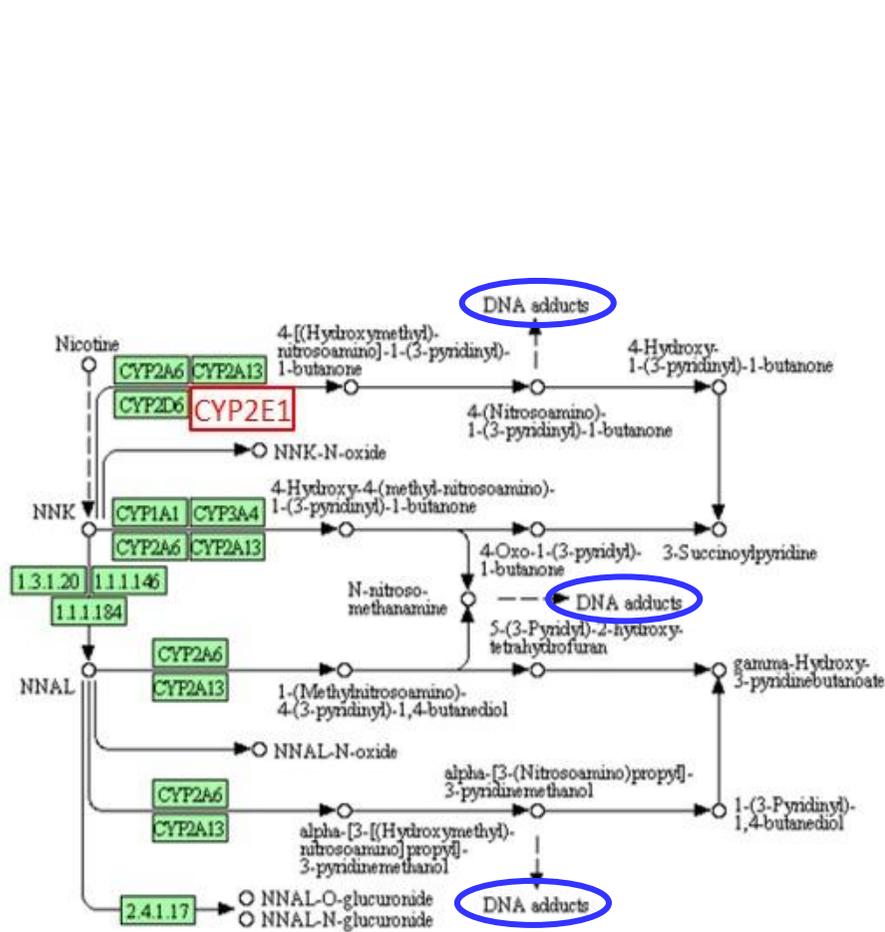
Em relação aos outros 10 genes que apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa, foi possível encontrar papéis importantes das enzimas codificadas por estes genes em 24 vias relacionadas às funções biológicas dos seres humanos (Quadro1). Dentre as quais, 17 vias foram associadas com o processo da carcinogênese (Figuras 11 - 22). As seis vias relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, serão apresentadas de maneira geral e exemplificada pela via na qual a serina esta envolvida (Figura 22). Deste modo serão discutidas 12 vias de acordo com os achados do presente estudo em OSCC. As sete vias restantes não foram relacionadas ao processo de desenvolvimento do câncer.<sup>(86)</sup>

**Quadro 1.** As vias metabólicas dos seres humanos relacionadas aos 10 genes diferencialmente expressos.

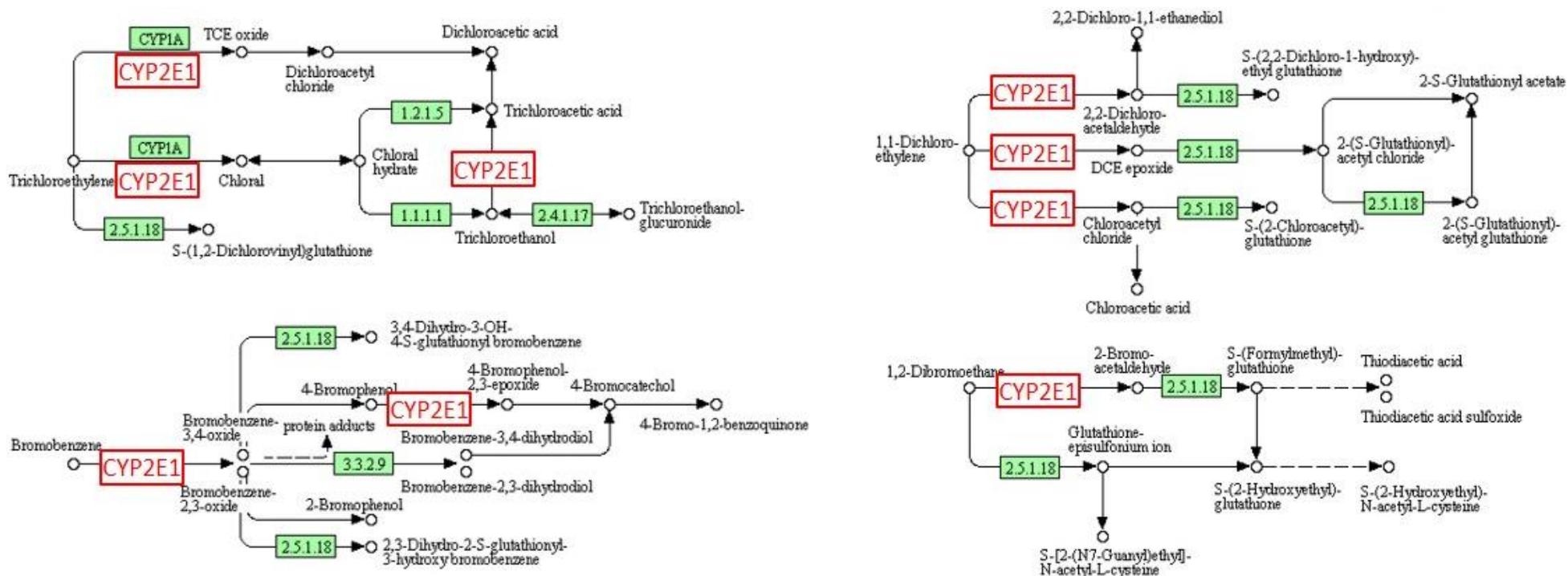
<b>Vias metabólicas em seres humanos</b>	<b>Genes</b>
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	CYP2E1
Carcinógenos químicos	CYP2E1
Metabolismo de drogas por citocromo P450	CYP2E1 e MAOB
Sinapse serotoninérgica	ALOX12, CYP2J2, CYP4X1 e MAOB
Metabolismo do ácido araquidônico	ALOX12, CYP2E1, CYP2J2, CYP2U1 e PTGIS
Regulação do mediador inflamatório dos canais <i>Transient Receptor Potential</i> -TRP	ALOX12 e CYP2J2
Via de sinalização do receptor ativado por proliferador peroxissomal-PPAR	CYP27A1
Biossíntese de esteroides	CYP2R1 e CYP27B1
Biossíntese do hormônio esteroide	CYP2E1
Biossíntese do ácido biliar primário	CYP27A1
Metabolismo do ácido linoleico	CYP2E1 e CYP2J2
Metabolismo de glicina, serina e treonina	MAOB

Metabolismo de tirosina	MAOB
Metabolismo de triptofano	MAOB
Metabolismo histidina	MAOB
Metabolismo de arginina e prolina	MAOB
Metabolismo fenilalanina	MAOB
Esteroidogênese Ovariana	CYP2J2
Tuberculose	CYP27B1
Doença hepática gordurosa não alcoólica - DHGNA	CYP2E1
Sinapse dopaminérgica	MAOB
Dependência de anfetamina	MAOB
Dependência de cocaína	MAOB
Alcoolismo	MAOB

A.



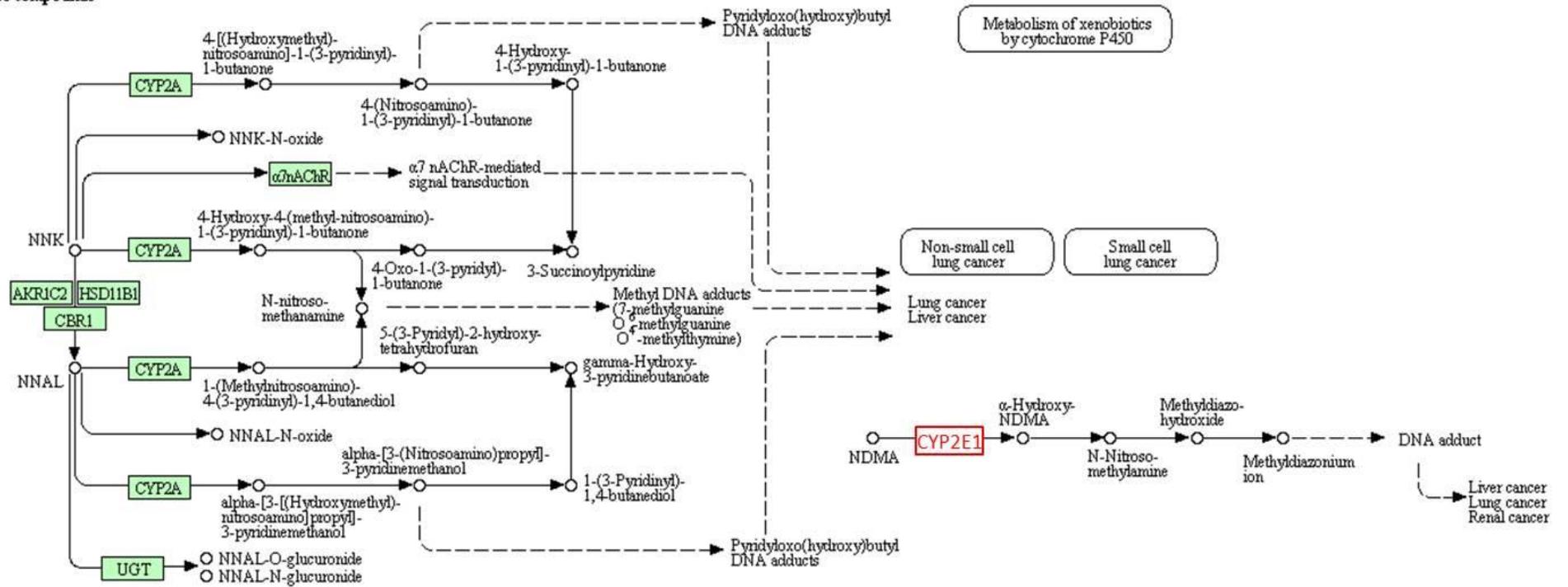
## B.



**Figura 11.** Metabolismo dos xenobióticos por meio das enzimas CYP450, disponível na base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferencialmente expressos estão destacados em vermelho. **A.** Xenobióticos: nicotina, naftalina e nitronaftalina, em azul os adutos de DNA. **B.** Xenobióticos: tricloetileno, bromobenzeno, dicloroetileno e dibromoetano.

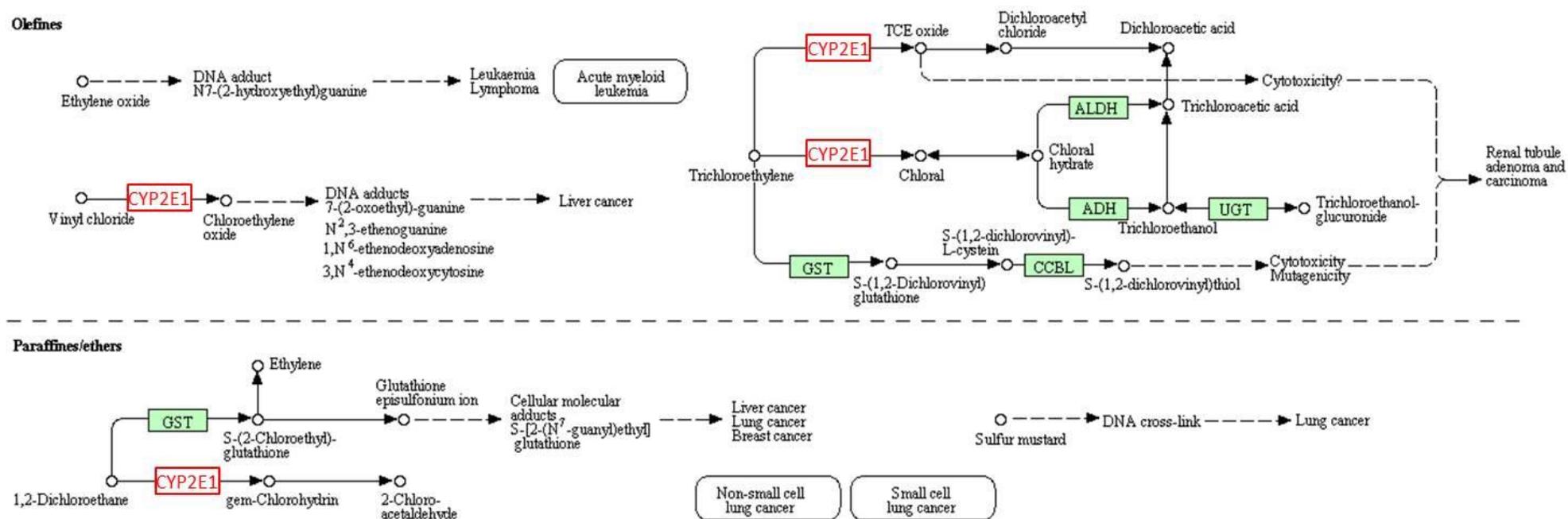
A.

**N-nitroso compounds**

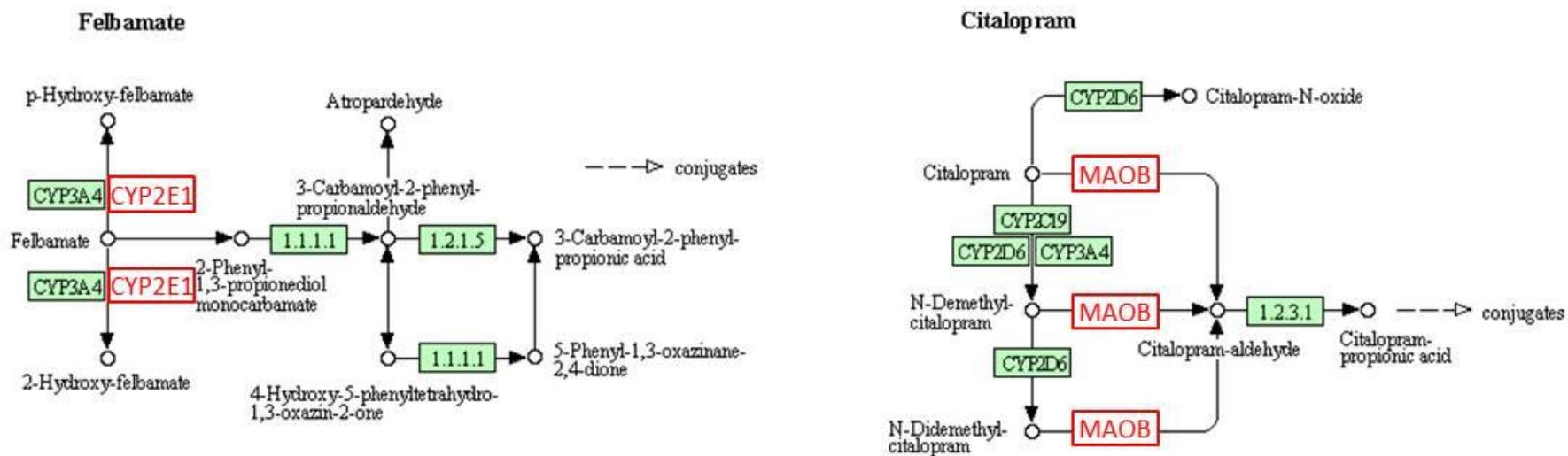


## B.

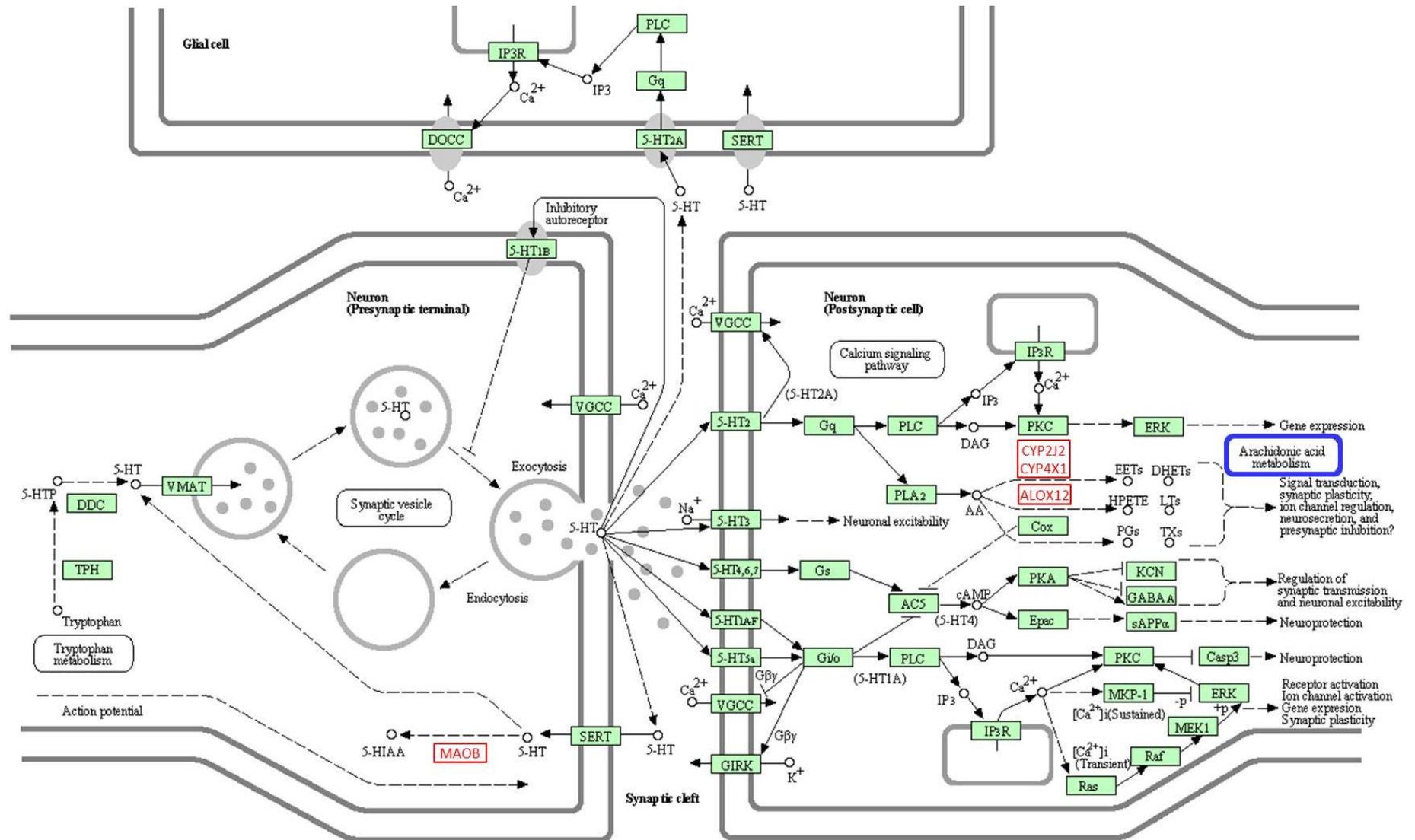
## Olefines



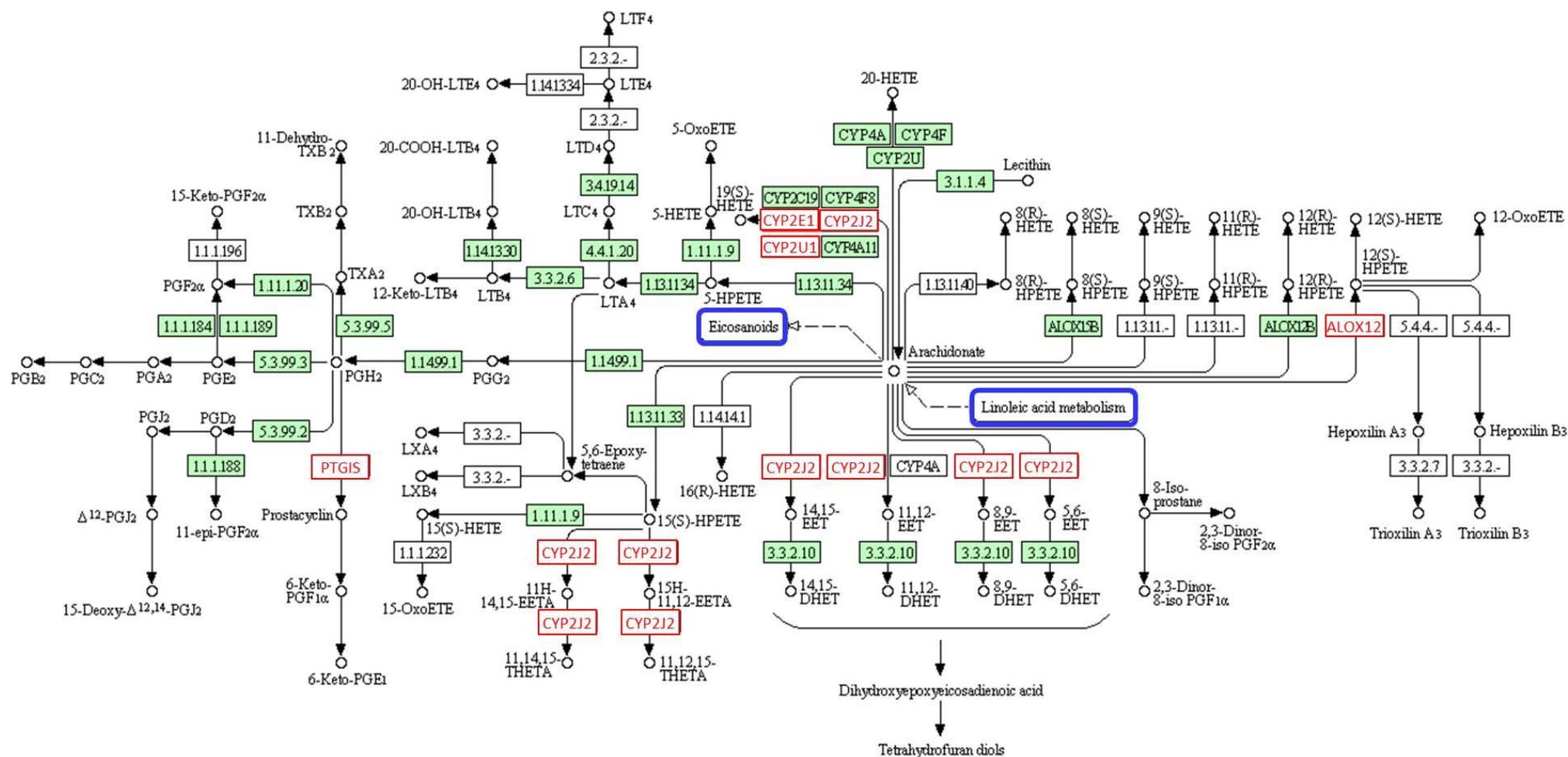
**Figura 12.** Via dos carcinógenos químicos, disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferencialmente expressos estão destacados em vermelho. **A.** Carcinógeno químico: componentes nitrosos. **B.** Carcinógenos químicos: olefins ou alcenos, parafinas e eters.



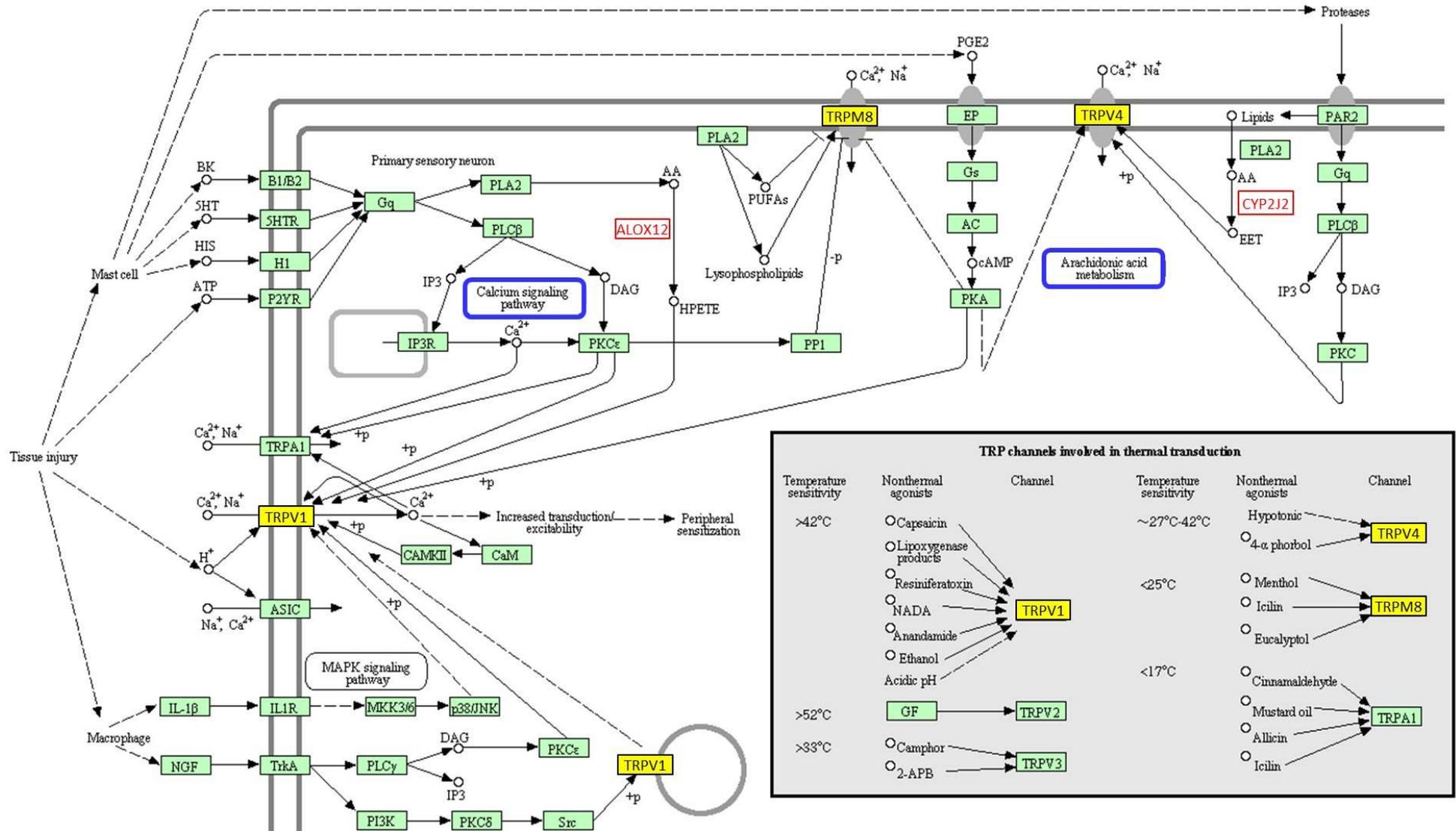
**Figura 13.** Metabolismo de drogas por meio das enzimas CYP450, disponível na base de dados - KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferencialmente expressos estão destacados em vermelho.



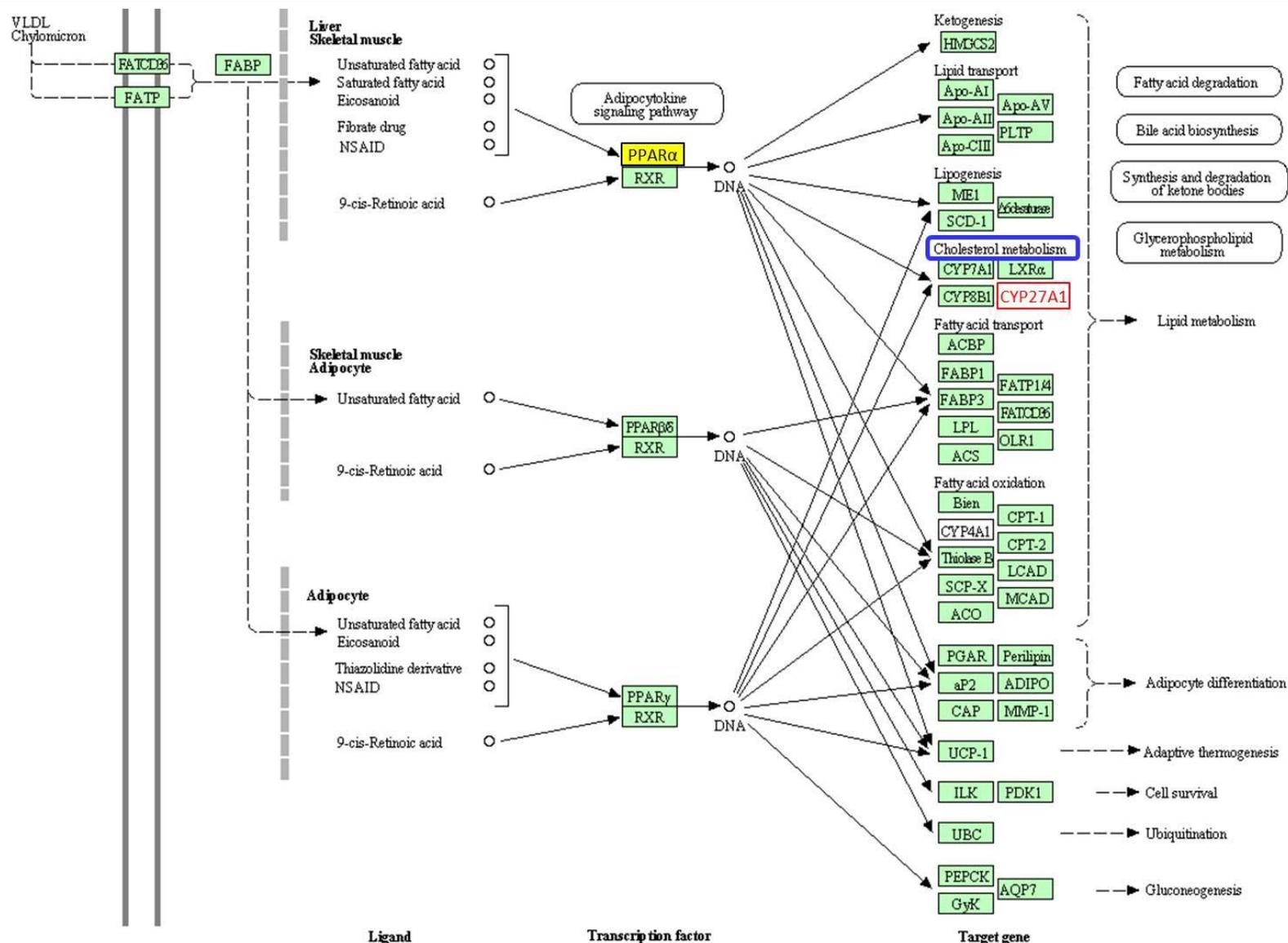
**Figura 14.** Sinapse serotoninérgica, disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferencialmente expressos estão destacados em vermelho e o Metabolismo do ácido araquidônico em azul.



**Figura 15.** Metabolismo do ácido araquidônico, disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferentemente expressos estão destacados em vermelho e outras vias metabólicas relacionadas em azul.



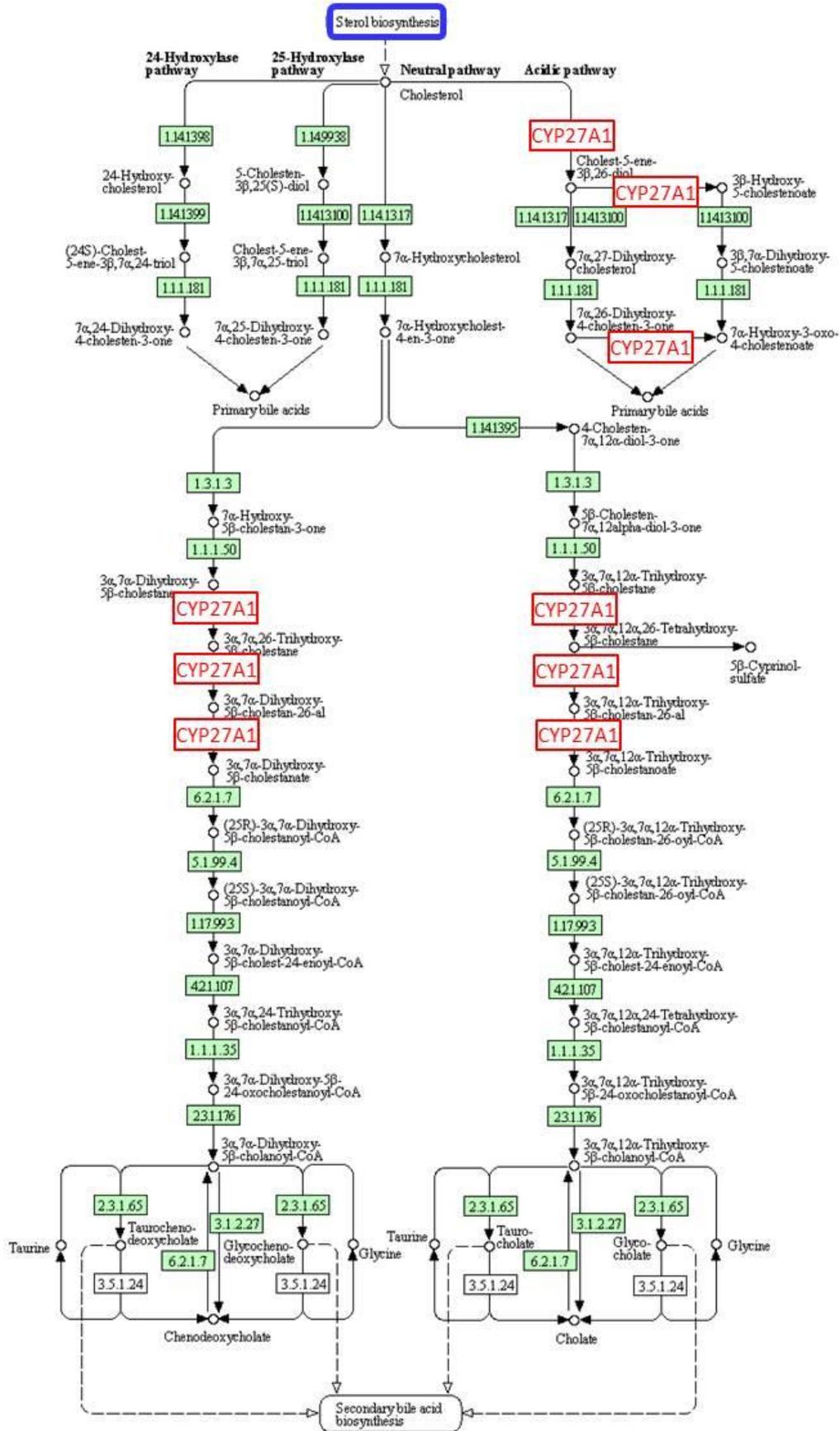
**Figura 16.** Via de regulação do mediador inflamatório dos canais de *Transient Receptor Potential* (TRP), disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> Os genes diferencialmente expressos estão destacados em vermelho, receptores associados em amarelo e outras vias metabólicas relacionadas em azul.



**Figura 17.** Via de sinalização do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR), disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> O gene diferencialmente expresso está destacado em vermelho, fator de transcrição associado em amarelo e metabolismo do colesterol relacionado em azul.







**Figura 20.** Via da biossíntese do ácido biliar primário, disponível na base de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).<sup>(86)</sup> O gene diferencialmente expresso está destacado em vermelho e a biossíntese de esteroides relacionada em azul.





## *4 DISCUSSÃO*

---

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observada expressão diferencial de doze genes em OSCC comparado aos tecidos não tumorais adjacentes. Os genes *CYP27A1*, *CYP2E1*, *CYP2R1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *CYP4F12*, *CYP4X1*, *CYP4B1*, *PTGIS* ou *CYP8A1*, *ALOX12* e *MAOB* apresentaram expressão reduzida, enquanto o gene *CYP27B1* apresentou expressão elevada. Foram identificadas 24 vias metabólicas, nas quais as enzimas codificadas por estes genes participam. Dessas vias, 12 estão associadas com o processo de carcinogênese e serão abordadas nessa discussão.

Os genes diferencialmente expressos codificam as enzimas da família das monoxigenases citocromo 450 (CYP450) e outras oxigenases, como araquidonato lipoxigenase (ALOX) e monoaminoxidase (MAO). Essas enzimas atuam em reações de oxidação adicionando uma ou mais moléculas de oxigênio.<sup>(90)</sup> De acordo com a literatura, alteração na expressão dessas enzimas pode estar relacionada com a carcinogênese de cavidade oral.<sup>(65,67,91)</sup>

As CYP450 e outras oxigenases investigadas estão envolvidas em várias vias metabólicas, porém no presente estudo foram abordadas 12 vias relacionadas aos processos envolvidos na carcinogênese, tais como metabolismo de compostos exógenos xenobióticos (*CYP2E1*), de carcinógenos químicos (*CYP2E1*), de drogas (*CYP2E1* e *MAOB*), sinapse serotoninérgica (*MAOB*), metabolismo do ácido araquidônico (*ALOX12*, *CYP2E1*, *CYP2J2*, *CYP2U1* e *PTGIS*), regulação do mediador inflamatório dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP) (*ALOX12* e *CYP2J2*), via de sinalização do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR) (*CYP27A1*), biossíntese de esteroides – dependente de vitamina D3 (*CYP2R1* e *CYP27B1*), biossíntese de hormônios esteroides (*CYP2E1*), biossíntese do ácido biliar

primário (CYP27A1), metabolismo do ácido linoleico (CYP2E1 e CYP2J2) e metabolismo de aminoácidos (MAOB). Algumas enzimas CYP450 e outras oxigenases podem atuar em mais de uma via metabólica. Para algumas delas, nenhuma função ou substrato foi identificado em seres humanos,<sup>(86)</sup> como é o caso das enzimas CYP4F12 e CYP4B1, cujos genes apresentaram expressão reduzida no presente estudo.

As enzimas CYP27B1, CYP27A1, CYP2E1, CYP2R1, CYP2J2, CYP2U1, CYP4F12, CYP4X1, CYP4B1 e PTGIS ou CYP8A1 pertencem à superfamília das CYP450. Essas enzimas são hemoproteínas (proteínas que contêm uma porfirina ligada ao ferro ou grupo heme) e incluem numerosas monoxigenases complexas.<sup>(90)</sup>

As enzimas CYP450 são classificadas de acordo com os seus principais substratos e suas funções em diferentes vias metabólicas. Estas enzimas catalisam a oxidação de vários xenobióticos químicos, incluindo drogas e carcinógenos ambientais. Estudos mostram que componentes químicos endógenos também são oxidados pelas CYP450, que utilizam como substratos endógenos: os ácidos graxos, ácido araquidônico (AA) e ácido linoleico, hormônios esteroides, tais como testosterona, progesterona e alopregnanolona, aminas, vitaminas lipossolúveis, como retinol e vitamina D3, e ácido biliar.<sup>(92)</sup>

As CYPs atuam na biotransformação oxidativa de xenobióticos, tais como drogas e outros compostos exógenos lipofílicos.<sup>(93)</sup> Na Fase I desse metabolismo essas enzimas catalisam a oxidação de substratos e em alguns casos reações de redução.<sup>(94)</sup> As reações de oxidação podem promover a ativação metabólica de carcinógenos químicos, como compostos nitrosos, olefinas ou alcenos, parafina e éter.<sup>(86,95)</sup> Por meio da adição de um ou mais grupamentos hidroxila no substrato pela ação da enzima CYP2E1, o composto pró-carcinogênico pode tornar-se carcinogênico,<sup>(49)</sup> e pode se ligar ao DNA.<sup>(95)</sup> Embora

nossos achados tem demonstrado redução da expressão do gene *CYP2E1* em OSCC, não podemos relatar modificação de sua atividade enzimática, uma vez que, mesmo com baixas concentrações da enzima, esta pode gerar os compostos carcinogênicos ativados.

A enzima *CYP2E1* atua no metabolismo de drogas catalisando a oxidação do felbamato, uma droga anticonvulsivante. Esta droga foi associada ao aumento da apoptose de células da medula óssea de ratos.<sup>(96)</sup> A expressão reduzida do gene *CYP2E1*, conforme observada no presente estudo, pode resultar na não metabolização do felbamato com conseqüente redução da apoptose celular, que poderia contribuir para o processo da carcinogênese. No entanto, a ingestão desse medicamento não foi avaliada no presente estudo.

Em relação ao metabolismo de drogas, além das enzimas CYP, a enzima Monoaminoxidase B (MAOB), codificada pelo gene *MAOB* (Gene ID:4129 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4129>),<sup>(88)</sup> é uma flavoenzima localizada nas membranas mitocondriais dos terminais nervosos, no fígado e outros órgãos. A MAO é importante na regulação da degradação metabólica de catecolaminas e serotonina no tecido nervoso ou nos tecidos alvo.<sup>(90)</sup> A diminuição da atividade da MAO pode interferir no efeito de drogas antidepressivas na neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica.<sup>(97)</sup>

No que se refere à neurotransmissão serotoninérgica, a inibição da enzima MAOB foi associada com aumento da proliferação celular em tumor de cólon, por meio do aumento de serotonina que atua como mediador da divisão celular. O tratamento com o antidepressivo citalopram, substrato para a enzima MAOB, foi associado com inibição da receptação de serotonina e conseqüente redução da proliferação celular,<sup>(98)</sup> redução

do tamanho tumoral em câncer colorretal, bem como o número de células tumorais circulantes.<sup>(99)</sup>

O citalopram é um Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina – ISRS. Neste caso, a inibição da enzima MAOB, que pode ser relacionada à sua baixa expressão resulta em ineficiente metabolização de citalopram, e a serotonina aumenta proliferação celular promovendo o desenvolvimento do tumor.<sup>(98)</sup>

Esses achados corroboram com nossos resultados, nos quais a enzima MAOB apresentou expressão reduzida em OSCC, o que também foi observado por Chen e colaboradores, em estudo realizado em Taiwan no ano de 2014, em câncer de faringe.<sup>(100)</sup> No entanto, a ingestão desse medicamento não foi avaliado no presente estudo.

A MAOB pertence a família das aminoxidases e também atua catalisando a desaminação oxidativa de monoaminas naturais biogênicas e compostos exógenos.<sup>(88,101)</sup> A ação desta enzima gera  $H_2O_2$  e aldeído(s) que são capazes de induzir a morte celular em cultura de várias linhagens celulares tumorais humanas.  $H_2O_2$  gerado pela reação de oxidação é capaz de atravessar a membrana interna das mitocôndrias e interagir diretamente com moléculas e estruturas endógenas, resultando em estresse oxidativo.<sup>(101)</sup>

Além da MAOB, as CYP450 também estão envolvidas no estresse oxidativo<sup>(37)</sup> Esse processo pode levar à danos ao DNA, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes da oxidação de metabólitos.<sup>(102)</sup> A produção de EROs pode ocorrer como resultado do consumo do cofator fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) pelas CYP450 microssomais que catalisam reações

de epoxidação, hidroxilação ou isomerização de compostos exógenos e como consequência do processo metabólico.<sup>(58,103,104)</sup>

ERO possui importante destaque na carcinogênese através da ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor.<sup>(102)</sup> O excesso de EROs acarreta danos oxidativos ao DNA, causando mutações que promovem o câncer.<sup>(105-107)</sup> Além disso, existem evidências de que o estresse oxidativo é um fator capaz de induzir a angiogênese, promovendo o crescimento metastático de células tumorais.<sup>(108)</sup> Índícios apontam que a produção de EROs tanto derivada do metabolismo mitocondrial quanto da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase induzem a expressão do gene fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF-A*).<sup>(109)</sup>

O desequilíbrio intracelular de EROs/antioxidantes pode resultar em estresse oxidativo e em uma série de condições patológicas, como câncer, aterosclerose, envelhecimento e também em processos fisiopatológicos como inflamação, apoptose e angiogênese.<sup>(110-112)</sup> A expressão reduzida dos genes que codificam MAOB e CYP2E1, envolvidas no estresse oxidativo, pode ter interferido no equilíbrio intracelular de EROs/antioxidantes e no desenvolvimento do OSCC nos pacientes do presente estudo.

Dentre os genes da superfamília *CYP450* que apresentaram expressão diferencial, os genes *CYP2E1*, *CYP2J2*, *CYP2U1* e *PTGIS* ou *CYP8A1* estão envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico (AA),<sup>(86)</sup> que está associado com processos inflamatórios importantes na carcinogênese de diferentes tipos de cânceres. Deste modo, a inibição da inflamação pode contribuir para redução dos processos inflamatórios associados à carcinogênese.<sup>(113)</sup>

O metabolismo do AA envolve as cicloxigenases (COX), araquidonato lipoxigenase (ALOX) e CYP450 epoxigenases, enzimas que utilizam o AA como precursor primário, gerando eicosanóides que incluem prostaglandinas, leucotrienos, ácidos hidroxi-eicosatetraenicos (HETEs), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) e ácidos hidroxiperoxieicosatetraenicos (HPETEs).<sup>(114,115)</sup> As enzimas CYP2E1, CYP2J2 e CYP2U1 participam do metabolismo do AA gerando 19-HPETE, e a CYP2J2 gera também EETs, hidroxí-ácidos epoxieicosatrienoicos (H-EETAs) e ácido trihidroxieicosatrienoico (THETAs). Vários estudos investigaram a associação do metabolismo do ácido araquidônico com o desenvolvimento do câncer.<sup>(58,116)</sup>

A enzima PTGIS (Gene ID: 5740 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5740>) também participa da via metabólica do AA, catalisando a conversão de prostaglandina H2 em prostaciclina (prostaglandina I2).<sup>(88)</sup> As vias metabólicas das prostaglandinas e do leucotrieno estão envolvidas na resposta inflamatória por meio do AA, um ácido graxo polinsaturado, que quando oxigenado é transformado em produtos que mediam ou modificam reações inflamatórias.<sup>(115)</sup>

Estudos mostram que a enzima PTGIS está associada com a progressão do câncer.<sup>(117,118)</sup> Atualmente esse mecanismo apresenta-se pouco compreendido. No entanto, não existem dados que confirmem essa relação da PTGIS no carcinoma de cabeça e pescoço. Embora um estudo que investigou carbaprostaciclina, análogo estável de PTGIS, demonstrou pouco efeito do análogo na migração celular em linhagem celular de câncer de cabeça e pescoço. O mesmo estudo sugere o efeito da PTGIS à sua capacidade de promover a vascularização.<sup>(119)</sup>

Nossos achados mostraram que após a análise estatística de correção, apenas o gene *PTGIS* manteve a significância estatística. Este gene mostrou padrão de expressão

reduzido nos pacientes com OSCC investigados. A enzima codificada por esse gene desempenha sua função no metabolismo do AA, mostrando que esta via pode ter contribuído para a carcinogênese oral do presente estudo. Essa possibilidade pode ser fundamentada nos dados da possível função antitumoral da PTGIS,<sup>(118)</sup> que em níveis reduzidos poderia contribuir para a carcinogênese.

Outro possível processo biológico no qual a PTGIS pode participar é o estresse oxidativo, por meio da resistência à insulina endotelial. Uma vez que, a via de sinalização de insulina pode aumentar a produção de superóxido, resultante do aumento de oxidação de ácidos graxos livres.<sup>(120)</sup>

A produção de metabólitos resultantes do metabolismo do AA, como os derivados pela metabolização das PTGIS regulam processos fisiológicos incluindo inflamação, angiogênese, coagulação, proliferação e resposta imunológica.<sup>(118,121)</sup> Outros produtos deste metabolismo, como EETs gerados pela ação das CYPs epoxigenases estão relacionados com efeitos anti-inflamatórios, com redução da infiltração celular, e também com vasodilatação e angiogênese.<sup>(122)</sup> A redução da expressão dos genes que codificam essas enzimas, assim como observado no nosso estudo, poderia contribuir para o aumento da inflamação na tumorigênese de cavidade oral.

Participando também do metabolismo do AA, o gene *ALOX12* (*ALOX12 Gene ID: 239* -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/239>)<sup>(88)</sup> também regula processos biológicos incluindo ativação de plaquetas, angiogênese, por meio da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), processo apoptótico, promovendo a sobrevivência de células vasculares, e controle da migração e proliferação celular.<sup>(88)</sup>

Alterações nas enzimas lipoxigenases, como ALOX, são relacionadas a várias doenças humanas, incluindo asma, aterosclerose, osteoporose e alguns tipos de

câncer.<sup>(88)</sup> A enzima ALOX12 é descrita como pro-carcinogênica, uma vez que converte o AA em 12-HPETE (ácidos hidroxiperoxieicosatetraenicos) e aumenta a expressão de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor - alfa* – TNF- $\alpha$ ).<sup>(123,124)</sup> No entanto, nos pacientes com OSCC do nosso estudo, o gene *ALOX12* apresentou expressão reduzida, que poderia diminuir a formação do composto 12-HPETE.

As enzimas ALOX12 e CYP2J2 desempenham as mesmas funções de gerar 12-HPETE e EETs (ácidos epoxieicosatrienoicos), respectivamente, a partir do AA em outra via, a via de regulação do mediador inflamatório dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP).<sup>(86)</sup> Nesta via ocorre uma cascata de reações após dano tecidual, onde há recrutamento de células de resposta imune como os macrófagos e mastócitos. Macrófagos liberam interleucinas e fatores de crescimento neural (NGF), e mastócitos liberam histaminas, proteases, triptases e quinases.<sup>(86,125)</sup> As proteases iniciam a cascata de reações responsáveis pela liberação do AA por meio da reação catalisada pela fosfolipases A2 (PLA2).<sup>(126)</sup>

Os TRP desta via são proteínas de canais catiônicos ativados por 12-HPETE e EETs e inibidos por outros ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), que pertencem à superfamília de sensores moleculares que permitem detecção de estímulos ambientais e promove os sentidos, tais como visão, paladar, olfato, tato, audição, propriocepção e sensação térmica.<sup>(127)</sup>

Os membros da superfamília TRPV1 (*Transient Receptor Potencial Vanilloid*) e TRPM8 (*Transient Receptor Potencial Melastatin*) estão expressos em células de câncer. Foi observado o aumento da expressão de TRPV1 (ativado pelo HPETE - ácidos hidroxiperoxieicosatetraenicos) correlacionado com crescimento acelerado de linhagem

celular de OSCC.<sup>(128)</sup> O TRPM8 também é expresso em outros tipos de tecidos tumorais como cólon, mama, pulmão e pele. Em câncer oral, a expressão de TRPM8 (inibido pelos PUFAs) pode estar associada com migração e invasão celular, no entanto, seu mecanismo de ação não está esclarecido na literatura.<sup>(129)</sup> TRPV4 é ativado pelos EETs (ácidos epoxieicosatrienoicos) gerados pela metabolização de AA por meio da CYP2J2,<sup>(130)</sup> porém, não foi associado com processos envolvidos na carcinogênese.

A via do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR) é uma via de sinalização de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos. Também está associada com os processos de oxidação de lipídeos, inflamação, proliferação e migração celular envolvidos na tumorigênese.<sup>(131-133)</sup>

O PPAR é ativado pelos metabólitos provenientes do metabolismo do AA, tais como, eicosanóides que incluem prostaglandinas, leucotrienos e ácidos graxos EETs, HETE e PUFAs.<sup>(86)</sup> A ativação do PPAR promove a expressão do gene *CYP27A1*, cuja enzima é metabolizadora do colesterol na via de síntese do ácido biliar primário.<sup>(86)</sup> No presente estudo a expressão reduzida de genes *CYP450*, *ALOX* e *PTGIS*, poderia estar associada com a diminuição da ativação de PPAR e conseqüente redução da expressão do gene *CYP27A1* nos tumores de cavidade oral investigados.

O colesterol proveniente da via de biossíntese de esteroides dependente de vitamina D3 é metabolizado pela CYP2R1 e posteriormente pela CYP27B1. O colesterol gerado pode seguir três caminhos: ser utilizado na via de síntese de hormônios esteroides, na qual também atua a enzima CYP2E1; pode ser metabolizado pela enzima CYP27A1 na via de síntese do ácido biliar; ou até mesmo ser direcionado para a via de degradação de esteroides.<sup>(86)</sup>

Lipídios esteroides, tais como colesterol, são biossintetizados por pelo menos trinta reações enzimáticas diferentes para formar quatro anéis de hidrocarbonetos ligados (hexágonos e pentágonos).<sup>(134)</sup> O colesterol é um componente integrante das membranas celulares, determina a rigidez e fluidez da membrana, e desempenha um papel importante na função, dinâmica e organização da membrana celular.<sup>(134)</sup>

Na biossíntese de esteroides, via responsável pela formação do colesterol, a Vitamina D3 é convertida em calcidiol pela ação da enzima CYP2R1 e posteriormente convertida a calcitriol (1,25(OH)2D3),<sup>(86)</sup> a forma circulante da Vitamina D3,<sup>(135)</sup> pela ação da enzima CYP27B1.<sup>(86)</sup>

Em nosso estudo as amostras de OSCC apresentam expressão reduzida do gene *CYP2R1*. Esse padrão de expressão pode ser explicado pela deficiência de vitamina D em pacientes com câncer evidenciada pela literatura,<sup>(136-138)</sup> que reduz a necessidade da atuação da enzima CYP2R1, uma vez que seu substrato (vitamina D3) pode apresentar-se reduzido nos pacientes do presente estudo. Os níveis de vitamina D sérica em pacientes com câncer de cabeça e pescoço pode ser modulada pela presença de polimorfismo *CYP2R1* A>C (rs10500804). A presença do alelo polimórfico C deste polimorfismo em câncer de cabeça e pescoço foi associado a redução dos níveis de vitamina D.<sup>(139)</sup>

A redução de vitamina D e redução da expressão do gene *CYP2R1* podem levar a redução de calcidiol, que é convertido em calcitriol pela CYP27B1. O gene *CYP27B1* apresentou expressão aumentada no presente estudo; entretanto, mesmo com aumento da CYP27B1, a quantidade reduzida de calcidiol não possibilita a formação de calcitriol, que é a forma ativa da vitamina D, a qual possui propriedades anti-tumorais.<sup>(138)</sup>

O calcitriol gerado pela CYP27B1 pode modular a expressão do gene *CYP2R1* em OSCC, e análogos da vitamina D podem ser potenciais agentes terapêuticos no controle da progressão de OSCC.<sup>(66)</sup> A forma calcitriol da Vitamina D3 atua como hormônio, e deficiência da vitamina D regula uma grande variedade de processos biológicos, como estresse oxidativo, interferindo no nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio de regulação da expressão de genes reguladores do sistema de antioxidantes.<sup>(138)</sup>

Além de regular a homeostase do cálcio que influencia na supressão de invasão de células tumorais, angiogênese e metástases.<sup>(136,138)</sup> A vitamina D também está relacionada a regulação na via de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), e pode modular o processo de autofagia.<sup>(138)</sup> Além disso a vitamina D, possui efeitos anti-mitóticos na diferenciação celular, inibindo a proliferação das células tumorais.<sup>(137)</sup>

Para muitos autores, a deficiência de vitamina D está associada à maior agressividade do tumor e à menor sobrevivência dos pacientes. Deste modo, é importante a investigação dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e o tratamento da insuficiência de vitamina D em pacientes com câncer.<sup>(137)</sup>

Além da Vitamina D, outros lipídeos esteroides, provenientes da biossíntese de hormônios esteroides,<sup>(86)</sup> tais como testosterona, androsterona, estrogênio e cortisona podem regular a sinalização celular para controlar uma infinidade de funções corporais.<sup>(86,134)</sup>

O hormônio masculino testosterona é formado pelo precursor pregnenolona por duas maneiras, por meio de delta-5 com formação de dehidroepiandrosterona (DHEA) e delta-4 com formação de androstenediona.<sup>(86)</sup> A formação de DHEA é catalisada pela CYP2E1. Os hormônios femininos estrona e estradiol (estrogênios) são formados a partir da testosterona e 4-androsterona-3,17-diona.<sup>(86)</sup>

Nossos resultados mostraram expressão reduzida do gene *CYP2E1*, que poderia influenciar nos níveis de testosterona, estrona e estradiol nos pacientes com OSCC investigados. Esses resultados concordam com estudo que observou sensibilidade do OSCC ao estrogênio e que este hormônio pode modular a interação da célula com a matriz extracelular por meio da expressão e tradução de integrinas.<sup>(140)</sup> Moléculas de adesão, tais como integrinas e proteínas da matriz extracelular como as lamininas estão associadas à proliferação celular, migração e invasão por regulação de interações da matriz extracelular com as células em vários tipos de cânceres, incluindo OSCC.<sup>(141-143)</sup>

O composto DHEA (dehidroepiandrosterona) gerado pela *CYP2E1* pode ser utilizado como potente agente de quimioprevenção de câncer, de acordo com investigações “in vivo” e “in vitro” que mostraram o potencial inibitório desse composto DHEA para carcinógenos químicos e mutações.<sup>(144)</sup> Em nosso estudo a expressão reduzida do gene *CYP2E1* pode estar relacionada ao desenvolvimento de OSCC, possivelmente pela redução da sua função como inibidor de agentes carcinógenos.

O colesterol proveniente da biossíntese de esteroides é utilizado como precursor na via de biossíntese do ácido biliar primário pela ação da *CYP27A1*.<sup>(86)</sup> Os ácidos biliares são lipídeos bioativos que desempenham papéis essenciais na manutenção da saúde. Estas moléculas possuem propriedades detergentes e possuem inúmeros efeitos benéficos em vários processos biológicos.<sup>(145)</sup>

Estudos recentes revelaram que o ácido biliar do tipo litocólico exibe um efeito citotóxico significativo nas células cancerosas em culturas derivadas de diferentes tecidos e organismos. A relação entre ácido litocólico e os mecanismos celulares e moleculares fundamentais aos efeitos de antienvhecimento e antitumorais tem sido

estabelecida.<sup>(145)</sup> A expressão reduzida do gene *CYP2E1* observada no presente estudo poderia levar a redução da síntese de ácido biliar primário, reduzindo seus efeitos antitumorais.

Entretanto, o ácido biliar foi associado com a progressão do carcinoma de esôfago. O receptor nuclear para o ácido biliar participa de estágios precoces do câncer promovendo inflamação e resistência a apoptose.<sup>(146)</sup> A alta concentração de ácido biliar em condições patológicas podem atuar como promotor endógeno de hepatocarcinogênese.<sup>(147)</sup>

Ademais, estudos “in vitro” têm mostrado que os hepatócitos podem ser afetados pelo ácido biliar por meio da indução de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a danos no DNA e apoptose. Os ácidos biliares hidrofóbicos como ácidos quenodeoxicólicos (CDCA), como glucuro-CDCA ou tauro-CDCA, foram associados à produção de EROs em linhagens celulares de hepatocarcinoma humano,<sup>(146)</sup> mostrando que o ácido biliar também pode interferir no estresse oxidativo.

Atuando também no metabolismo do ácido linoleico, um ácido graxo, as enzimas *CYP2E1* e *CYP2J2* utilizam o composto linoleato (ácido linoleico) como precursor para gerar as leucotoxinas, tais como ácidos epoxioctadecanoicos (EpOME). O linoleato também pode ser convertido à araquidonato e ser direcionado para o metabolismo do AA, ou pode ser utilizado pelas *CYP2E1* e *CYP2J2* como substrato.<sup>(86)</sup> Os genes *CYP2E1* e *CYP2J2* apresentaram expressão reduzida em OSCC no presente estudo. Essa expressão reduzida poderia levar ao aumento dos níveis de linoleato. Aumento da proliferação celular foi observado após o tratamento de células de esôfago com ácido linoleico, precursor também da prostaglandina E2 (PE2). O tratamento com PE2 é

também associada ao aumento de proliferação celular, sugerindo que estes compostos influenciam na predisposição ao desenvolvimento do carcinoma de esôfago.<sup>(148)</sup>

O potencial de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de língua foi observado em estudo que realizou a administração de óleo diacilglicerol, cuja composição é de 46,6% de ácido linoleico, em ratos transgênicos portadores do proto-oncogene *c-Ha-ras* humano, que quando comparado com ratos selvagens que não apresentaram desenvolvimento de tumores.<sup>(149)</sup> Uma vez que, o diacilglicerol atua como efetor da expansão clonal de células com mutação de *ras*,<sup>(150)</sup> evidenciando uma importância da expressão elevada de *ras*.

Em nosso estudo os genes codificadores das enzimas CYP2E1 e CYP2J2 responsáveis pela metabolização do ácido linoleico mostraram expressão reduzida em carcinoma oral de células escamosas. Deste modo, poderia ocorrer aumento dos níveis de ácido linoleico. De acordo com os achados em relação a investigação de diacilglicerol, o aumento do ácido linoleico pode promover o potencial de desenvolvimento de câncer oral.<sup>(149)</sup>

Outro mecanismo importante para o processo de carcinogênese é o metabolismo de aminoácidos, tais como tirosina, glicina, serina, treonina, triptofano, histidina, arginina, prolina e fenilalanina. A enzima MAOB, além de estar envolvida no metabolismo de drogas e no estresse oxidativo, também participa do metabolismo desses aminoácidos.<sup>(86)</sup>

Os aminoácidos têm um duplo papel no metabolismo celular, atuando como precursores para a síntese de proteínas e participando como metabólitos intermediários em outras reações biossintéticas. A alteração na regulação destes processos geralmente é observada no câncer. A via que metaboliza estes aminoácidos é requerida em vários

tipos de câncer, representados por serina e glutamina que são os aminoácidos mais utilizados pelas células tumorais.<sup>(151)</sup>

Os aminoácidos são utilizados na maquinaria do mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), também alterado no câncer. O mTOR é um regulador chave do crescimento por meio da modulação de processos incluindo síntese proteica e autofagia. A deficiência de vitamina D foi relacionada a regulação da maquinaria mTOR.<sup>(138)</sup> No entanto, o caminho pelo qual a alteração na via de metabolismo dos aminoácidos pode levar a transformação celular permanece inconclusivo.<sup>(151)</sup>

O padrão de expressão reduzido do gene *MAOB* no presente estudo, pode estar associado a alterações no metabolismo dos aminoácidos, além de influenciar na maquinaria de mTOR e contribuir para o desenvolvimento de OSCC dos pacientes.

Nossos resultados mostraram que os genes diferencialmente expressos podem modular diversos processos biológicos envolvidos na carcinogênese do carcinoma oral de células escamosas. Deste modo, para estabelecer a relação entre o padrão de expressão dos genes investigados e o carcinoma oral de células escamosas há necessidade de ampliação dos estudos para replicação dos dados obtidos e validação dos achados por meio de validação proteica.

## *5 CONCLUSÕES*

## 5. CONCLUSÕES

Os genes *CYP27A1*, *CYP2E1*, *CYP2R1*, *CYP2J2*, *CYP2U1*, *CYP4F12*, *CYP4X1*, *CYP4B1*, *PTGIS* ou *CYP8A1*, *ALOX12* e *MAOB* apresentam expressão diminuída, enquanto o gene *CYP27B1* apresenta expressão aumentada em carcinoma oral de células escamosas quando comparado com tecido não tumoral.

As enzimas codificadas pelos genes diferencialmente expressos desempenham funções em diversos processos biológicos, tais como na biotransformação de compostos exógenos, por meio do metabolismo de xenobióticos, carcinógenos químicos e drogas, e compostos endógenos no metabolismo do ácido araquidônico, biossínteses de esteroides dependente de vitamina D3, hormônios esteroides, ácidos biliar primário e linoleico, e metabolismo de aminoácidos. Essas enzimas também participam da sinapse serotoninérgica, regulação do mediador inflamatório dos canais de receptor de potencial transiente e da via de sinalização do receptor ativado por proliferador peroxissomal.

O padrão de expressão diferencial dos genes estudados pode modular os processos que contribuem para o desenvolvimento do carcinoma oral de células escamosas, tais como processos inflamatórios, inibição de agentes cancerígenos, oxidação de lipídeos, estresse oxidativo, autofagia, apoptose, diferenciação e proliferação celular, tumorigênese, angiogênese e vasodilatação que contribuem para a migração e invasão de células cancerígenas em tecido de diferente tipo histológico, promovendo a metástase à distância.

Investigações futuras com ampliação do grupo amostral, assim como, validação proteica são necessárias para estabelecer a relação entre o padrão de expressão dos genes investigados e o carcinoma oral de células escamosas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gao J, Panizza B, Johnson NW, Coman S, Clough AR. Basic consideration of research strategies for head and neck cancer. *Front Med*. 2012;6(4):339-53.
2. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*, 17, 24-9, 2005.
3. Inglehart RC, Scanlon CS1, D'Silva NJ2. Reviewing and reconsidering invasion assays in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2014;50(12):1137-43.
4. Mogilner R, Elishoov H. Oral cancer--not only a disease of elder patients with risk factors. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 2015 Jan;32(1):46-8, 63.
5. Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 11/06/2015.
6. Nagaraj NS. Evolving 'omics' technologies for diagnostics of head and neck cancer. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2009.
7. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8549-56.
8. Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol* 2014;50(6):587–92.
9. Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Rozek LS, et al. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral Oncol* 2010;46(8):591-6.
10. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11(1): 9-22.

11. Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CD, Pavarino ÉC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2):239-47.
12. Cadoni G, Boccia S, Petrelli L, Di Giannantonio P, Arzani D, Giorgio A, De Feo E, Pandolfini M, Galli P, Paludetti G, Ricciardi G. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2012;32(1):1-11.
13. Ruback MJ, Galbiatti AL, Arantes LM, Marucci GH, Russo A, Ruiz-Cintra MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(5):307-13.
14. Calzada AP, St. John MA, Abemayor E, Wong DTW. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer. *Molecular Surgical Pathology*. 2013; 307-323.
15. Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol*. 2015;51(8):727-30. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.03.015.
16. Katsanos KH1, Roda G1, Brygo A2, Delaporte E3, Colombel JF4 Oral Cancer and Oral Precancerous Lesions in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *J Crohns Colitis*. 2015 Jul 10. pii: jjv122.
17. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo E. Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúde*. 2006; 13: 34-38.
18. Rogin, CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Den Res* 2007; 86: 104-114.

19. Rusin P., Markiewicz Ł., Majsterek I. Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw*, 2008;62:490-501.
20. Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55(2):165-174.
21. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122(6):1951-7.
22. Parmigiani RB, Camargo AA. O genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira, CG; Rocha, JC (Org.). *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu 2004; 3-11.
23. van Zyl A1, Bunn BK. Clinical features of oral cancer. *SADJ*. 2012;67(10):566-9.
24. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. *Cancer*. 2007; 110: 1593-601.
25. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínicoepidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Ver. Bras. Otorrinolaringol*. 2004; 70: 35-40.
26. Lung T, Tascau OC, Almasan HA, Muresan O. Head and neck cancer, epidemiology and histological aspects- Part 1: A decade's result 1993-2002. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2007; 35: 120-5.
27. Zuo L, Wang K, Zhang X, Pan X, Wang G, Krystal JH, Zhang H, Luo X. Sex chromosome-wide association analysis suggested male-specific risk genes for alcohol dependence. *Psychiatr Genet*. 2013;23(6):233-8.
28. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2014;50(6):565-74.

29. Psyrrri A, Rampias T, Vermorken JB. The current and future impact of human papillomavirus on treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* 2014;25(11):2101-15.
30. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res.* 2009;88(4):300-6.
31. Sink J, Kademani D. Maxillofacial oncology at the University of Minnesota: treating the epidemic of oral cancer. *Northwest Dent.* 2011;90(3):13-6, 38.
32. INCT-HPV – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus do HPV: [www.incthpv.org.br/SobreHpv/Default.aspx](http://www.incthpv.org.br/SobreHpv/Default.aspx), 2015.
33. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(4):761-70.
34. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007; 62: 361-6.
35. Liu J, Wang Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:294303. doi: 10.1155/2015/294303.
36. Pavarino EC, Russo A, Galbiatti ALS, Almeida WP, Goloni Bertollo EM. Glutathione: biosynthesis and mechanism of action. In: Labrou N, Fliemetakis E, editors. *Glutathione: biochemistry, mechanisms of action and biotechnological implications.* New York: Nova Science Publishers Inc; 2013. p. 7–10.

37. Linhart K, Bartsch H, Seitz HK. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014;3:56-62.
38. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino EC, et al. Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 4181-8.
39. Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Roy A, Sharma P. Reconvene and Reconnect the Antioxidant Hypothesis in Human Health and Disease. *Ind J Clin Biochem* 2010;25(3):225–243.
40. Janbaz KH, Qadir MI, Bassar HT, Bokhari TH, Ahmad B. Risk for oral cancer from smokeless tobacco. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(3):160-4.
41. Roswall N and Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *J Prev Med Public Health*. 2015;48(1):1-9. doi: 10.3961/jpmph.14.052.
42. Varoni EM, Lodi G, Iriti M. Ethanol versus Phytochemicals in Wine: Oral Cancer Risk in a Light Drinking Perspective. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 27;16(8):17029-47. doi: 10.3390/ijms160817029.
43. Biselli JM, Leal RCAC, Ruiz MT, Maniglia JV, Rossit ARB, et al. Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorinolaringol* 2006;72:654-8.
44. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LCL, Maniglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT. et al. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras* 2006;52:365-8.

45. Leme CV, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti AL, Maniglia JV, et al. GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer patients. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(3):299-303.
46. Russo, A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011.
47. Hernando-Rodriguez M, Rey-Barja N, Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A, Aguirre-Urizar JM. Role of cytochrome P-450 genetic polymorphisms in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(1):1-8.
48. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep* 2012;39(2):1055-63.
49. Go RE, Hwang KA, Choi KC. Cytochrome P450 1 family and cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Mar;147:24-30. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.003.
50. Szaefer H, Cichocki M, Majchrzak-Celińska A. New cytochrome P450 isoforms as cancer biomarkers and targets for chemopreventive and chemotherapeutic agents *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:709-18.
51. Václavíková R, Hughes DJ, Souček P. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. *Gene.* 2015;571(1):1-8. doi: 10.1016/j.gene.2015.07.071. Epub 2015 Jul 26.
52. Shahabi P, Siest G, Meyer UA, Visvikis-Siest S. Human cytochrome P450 epoxygenases: variability in expression and role in inflammation-related disorders. *Pharmacol Ther.* 2014;144(2):134-61.

53. Bock KW. Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system. *Biochem Pharmacol.* 2014;90(1):1-6.
54. Juliano, R. L., and Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 455(1): 152-162.
55. Pal D, Kwatra D, Minocha M, Paturi DK, Budda B, Mitra AK. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci.* 2010; 23;88(21-22):959-71.
56. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci.* 2011;1:49-75.
57. Xu X, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Jul 18;63(8):597-609. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.006. Epub 2011 Apr 6.
58. Zelasko S1, Arnold WR2, Das A3. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;116-117:112-23. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2014.11.002.
59. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 93-100, doi: 10.1007/s00432-007-0254-5.

60. Pikuleva IA and Waterman MR. Cytochromes P450: Roles in Diseases. *J Biol Chem.* 2013; 288(24): 17091–17098.
61. Lynch T, Price A. The effects of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Phys,* 76, 391-6, 2007.
62. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol.* 2014;88(12):2135-90.
63. Masood N, Malik FA, Kayani MA. Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011-b;12(2):377-82.
64. Shatalova EG, Klein-Szanto AJ, Devarajan K, Cukierman E, Clapper ML. Estrogen and cytochrome P450 1B1 contribute to both early- and late-stage head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(1):107-15.
65. Hwang PH, Lian L, Zavras AI. Alcohol intake and folate antagonism via CYP2E1 and ALDH1: effects on oral carcinogenesis. *Med Hypotheses.* 2012;78(2):197-202.
66. Sundaram K, Sambandam Y, Tsuruga E, Wagner CL, Reddy SV. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 modulates CYP2R1 gene expression in human oral squamous cell carcinoma tumor cells. *Horm Cancer.* 2014;5(2):90-7.
67. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998; 9: 99-108, 10.1023/A:1008809706062.
68. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3155-3159.

69. Lessa GS, De Moraes ED, Carvalho EC, Agra I. Quimioterapia nos tumores de cabeça e pescoço. Em Guimarães, JRQ. Manual de oncologia, 3ª ed. Editora BBS, São Paulo, 2008; p. 1333 e 1334.
70. Sobin L, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition: UICC; 2009.
71. American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer Staging Manual 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. eds. New York: Springer; 2009.
72. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1304-10.
73. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S: Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infect Agent Cancer* 2007; 2:11.
74. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S: Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. *BMC Clin Pathol* 2009;9:3.
75. Khair MM, Mzibri ME, Mhand RA, Benider A, Benchekroun N, Fahime EM, et al. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus in cervical carcinoma biopsies in an area of high incidence of cancer from Moroccan women. *J Med Virol* 2009;81(4):678-84.
76. Qmichou Z, Khyatti M, Berraho M, Ennaji MM, Benbacer L, Nejjari C, et al. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infect Dis* 2013;13(1):378.

77. Singh S, Bhat MK. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively active nuclear factor-kappaB in human HPV-18 E6-positive HEp-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(2):346-53.
78. ATCC – American Type Culture Collection: [www.atcc.org/en/Guides/Guides.aspx](http://www.atcc.org/en/Guides/Guides.aspx), 2014
79. de Oliveira CM, Bravo IG, Genta MLND, Fregnani JHTG, Longatto-Filho A, Levi JE. Inter- and intra- host HPV16 genetic diversity in patients with invasive cervical cancer [Resumo]. 29th International Papillomavirus Conference and Public Health & Clinical Workshops 2014:137.
80. Centrone C, de Oliveira CM, Fregnani JH Longatto-Filho A, Carvalho J, Levi JE. Detection of HPV DNA in plasma samples of women with invasive cervical cancer (ICC) from Sao Paulo, Brazil. [Resumo]. 29th International Papillomavirus Conference and Public Health & Clinical Workshops 2014:152.
81. Chicote, PMB. Expressão de isoformas do gene *VEGF* e de proteínas reguladoras de *splicing* em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011.
82. Biselli, JM. Expressão diferencial de microRNAs em células monocelulares do sangue periférico de crianças com síndrome de Down [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011.
83. Vandesompele J1, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

- 
84. Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 2001;25:402–8.
  85. Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B* 1995;57(1): 289-300.
  86. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG, disponível em: <http://www.genome.jp/kegg>.
  87. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins Information (STRING), disponível em <http://string-db.org/>
  88. National Center for Biotechnology (NCBI), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
  89. *GeneCards®: The Human Gene Database* disponível em: <http://www.genecards.org/>.
  90. Descritores em Ciências da Saúde – DeCS, disponível em: <http://decs.bvs.br/>
  91. Takiguchi M1, Darwish WS, Ikenaka Y, Ohno M, Ishizuka M. Metabolic activation of heterocyclic amines and expression of CYP1A1 in the tongue. *Toxicol Sci.* 2010;116(1):79-91.
  92. Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Oxidation of endobiotics mediated by xenobiotic-metabolizing forms of human cytochrome. *Curr Drug Metab* 2009;10(7):700-12.
  93. Nelson, DR. Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol* 2004;320:1–10.
  94. Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T et al. *Front Biosci* 2004;9:1967–1976.

- 
95. Metabolism of drugs and other xenobiotics. Anzenbacher P and Zanger UM. eds Germany: Wiley-VCH 2012:614.
  96. Husain Z, Pinto C, Sofia RD, Yunis EJ. Felbamate-induced apoptosis of hematopoietic cells is mediated by redox-sensitive and redox-independent pathways. *Epilepsy Res* 2002;48(1-2):57-69.
  97. Fisar Z, Hroudová J, Raboch J. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31(5):645-56.
  98. Steingart AB, Cotterchio M. Do antidepressants cause, promote, or inhibit cancers? *J Clin Epidemiol* 1995;48(11):1407-12.
  99. van Noort V, Schölch S, Iskar M, Zeller G, Ostertag K, Schweitzer C. Novel drug candidates for the treatment of metastatic colorectal cancer through global inverse gene-expression profiling. *Cancer Res* 2014;74(20):5690-9.
  100. Chen PH, Huang B, Shieh TY, Wang YH, Chen YK, Wu JH, Huang JH, Chen CC, Lee KW. The influence of monoamine oxidase variants on the risk of betel quid-associated oral and pharyngeal cancer. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:183548.
  101. Agostinelli E, Arancia G, Vedova LD, Belli F, Marra M, Salvi M, et al. The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 2004;27(3-4):347-58.
  102. Choudhari KC, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncology* 2014;50:10–18.
  103. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199(3):316-31.

- 
104. Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother.* 2005 Aug;59(7):374-9.
105. Friedberg EC and Meira LB. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage version 7. *DNA Repair* 2006;5:189- 209.
106. Gupta RK, Patel AK, Kumar R, Chugh S, Shrivastav C, Mehra S, et al. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a case control study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012;13:6295-8.
107. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2014;15:4405-4409.
108. Saeidnia S and Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Aug 15;271(1):49-63.
109. Chen TC, Sakaki T, Yamamoto K, Kittaka A. The roles of cytochrome P450 enzymes in prostate cancer development and treatment. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):291-8.
110. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 1998;24:111-112:1-14.
111. Biswas SK and Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):60-76.
112. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009;390(3):191-214.

- 
- 113.Chen X, Wang S, Wu N, Yang CS. Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004 May;4(3):267-83.
- 114.Wang D and Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):181-93.
- 115.Connor AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Pinkston CM, Boone SD, John EM, et al. Associations between ALOX, COX, and CRP polymorphisms and breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: The breast cancer health disparities study. *Mol Carcinog*. 2014;22.
- 116.Chen C, Wang DW. CYP epoxygenase derived EETs: from cardiovascular protection to human cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(12):1454-69.
- 117.Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3-4):525-34.
- 118.Cathcart MC, Reynolds JV, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(2):153-66.
- 119.Camacho M, Piñeiro Z, Alcolea S, García J, Balart J, Terra X, et al. Prostacyclin-synthase expression in head and neck carcinoma patients and its prognostic value in the response to radiotherapy. *J Pathol* 2015;235(1):125-35.
- 120.Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. *World J Diabetes* 2015;6(2):326-32.
- 121.Menna C, Olivieri F, Catalano A, Procopio A. Lipoxygenase inhibitors for cancer prevention: Promises and risks. *Curr Pharm Des* 2010;16:725–733.
- 122.Fleming I. Cytochrome P450-dependent eicosanoid production and crosstalk. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(5):403-9.

- 
- 123.Chakrabarti SK, Cole BK, Wen Y, Keller SR, Nadler JL. 12/15lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1657–1663.
- 124.Kleinstein SE, Heath L, Makar KW, Poole EM, Seufert BL, Slattery ML, et al. Genetic variation in the lipoxygenase pathway and risk of colorectal neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52:437–449.
- 125.Urb M, Sheppard DC. The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog* 2012;8(4):e1002619.
- 126.Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *J Biochem* 2002;131(3):285-92.
- 127.Liu C, Montell C. Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460(1):22-5.
- 128.Marincsák R, Tóth BI, Czifra G, Márton I, Rédl P, Tar I et al. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis* 2009;15:328-335.
- 129.Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J. Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2012;40(5):1431-40.
- 130.Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol* 2008;155(1):4-16.
- 131.Schweitzer A, Knauer SK, Stauber RH. Nuclear receptors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Int J Cancer* 2010;126(4):801-9.
- 132.Zhang Z, Xu Y, Xu Q, Hou Y. PPAR $\gamma$  against tumors by different signaling pathways. *Onkologie* 2013;36(10):598-601.

- 
133. Burotto M, Szabo E. PPAR $\gamma$  in head and neck cancer prevention. *Oral Oncol* 2014;50(10):924-9.
134. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2015;16(1):924-49.
135. Heaney RP. Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3(5):1535-41.
136. Wu X, Zhou T, Cao N, Ni J, Wang X. Role of Vitamin D Metabolism and Activity on Carcinogenesis. *Oncol Res* 2015;22(3):129-37.
137. Tomíška M, Novotná Š, Klvačová L, Tůmová J, Janíková A. Vitamin D during cancer treatment. *Klin Onkol* 2015;28(2):99-104.
138. Berridge MJ. Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460(1):53-71.
139. Azad AK, Bairati I, Qiu X, Huang H, Cheng D, Liu G, et al. Genetic sequence variants in vitamin D metabolism pathway genes, serum vitamin D level and outcome in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2013;132(11):2520-7.
140. Nelson K, Helmstaedter V, Moreau C, Lage H. Estradiol, tamoxifen and ICI 182,780 alter  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 1 integrin expression and laminin-1 adhesion in oral squamous cell carcinoma cell cultures. *Oral Oncol* 2008;44(1):94-9.
141. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature* 2001;411:375–9.
142. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004;90:561–5.
143. Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2006;6:175–83.

- 
144. Yang S, Fu Z, Wang F, Cao Y, Han R. Anti-mutagenicity activity of dehydroepiandrosterone. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002;24(2):137-40.
145. Arlia-Ciommo A, Piano A, Svistkova V, Mohtashami S, Titorenko VI. Mechanisms underlying the anti-aging and anti-tumor effects of lithocholic bile acid. *Int J Mol Sci* 2014;15(9):16522-43.
146. Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM, et al. Bile acids: from digestion to cancers. *Biochimie* 2013;95(3):504-17.
147. Tsuda H, Masui T, Imaida K, Fukushima S, Ito N. Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of gamma-glutamyl transpeptidase-positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats. *Gan* 1984;75(10):871-5.
148. Pink RC, Bailey TA, Iputo JE, Sammon AM, Woodman AC, Carter DR. Molecular basis for maize as a risk factor for esophageal cancer in a South African population via a prostaglandin E2 positive feedback mechanism. *Nutr Cancer* 2011;63(5):714-21.
149. Tsuda H, Iigo M, Takasuka N, Ueda S, Ohshima Y, Fukamachi K, et al. Possible enhancing activity of diacylglycerol on 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis of the tongue in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. *Food Chem Toxicol* 2007;45(6):1013-9.
150. Mills KJ, Reynolds SH, Smart RC. Diacylglycerol is an effector of the clonal expansion of cells containing activated Ha-ras genes. *Carcinogenesis* 1993;14:2645-2648.
151. Tsun ZY, Possemato R. Amino acid management in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015;pii:S1084-9521(15)00146-9.

## *7. ANEXOS*

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94  
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 216.758

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto de pesquisa CAAE 13577013.0.0000.5415 sob a responsabilidade de **Anelise Russo** com o título "Expressão de genes envolvidos na via de metabolização de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 12 de março de 2013.

**Prof. Dr. Fernando Batigália**  
**Presidente do CEP/FAMERP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: **Expressão de genes envolvidos na via de metabolização de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.**

Pesquisadora Responsável: Msc. Anelise Russo

Eu.....RG.....  
nascido(a) em ...../...../..... e domiciliado(a) à .....  
município de .....usuário (a) (ou responsável legal pelo  
usuário).....  
declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa “**Expressão de genes envolvidos na via de metabolização de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.**” e que também fui satisfatoriamente esclarecido(a) que:

- A)** O objetivo do estudo é investigar o material genético de tumores de pacientes com câncer de cabeça e pescoço;
- B)** Durante a cirurgia, o médico irá remover o tumor e um pedaço dele não será usado para diagnóstico e poderá ser congelado e armazenado no laboratório para posteriormente ser utilizado para estudo genético/molecular compondo um banco de amostras biológicas, podendo ser utilizado em futuros estudos após aprovação de um novo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP. A obtenção deste fragmento não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e não resultará em aumento no tempo de operação ou na extensão da cirurgia;
- C)** Será utilizado um grupo controle com as margens dos tumores (tecidos aparentemente normais);
- D)** O material será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas;
- E)** Todas as informações obtidas por meio da história clínica e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;
- F)** Se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do material, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de modo algum, o meu tratamento;
- G)** Esse estudo é importante porque pode colaborar para o conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor;
- H)** Os resultados serão divulgados após a conclusão do estudo em forma de artigos científicos ou trabalhos apresentados em congressos.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

RG do prontuário médico:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelo endereço abaixo indicado.

Pesquisador responsável:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17)3201-5700, ramal 5813.

## Biomarcadores para o câncer de cabeça e pescoço – Questionário

### Dados Gerais e demográficos:

Nome.....sexo.....

Prontuário.....

Local e data de nascimento .....

Endereço: Rua.....Nº.....fone.....

Bairro.....Cidade.....CEP.....

Etnia.....Ocupação.....Escolaridade.....

Data da coleta:.....

### Dados do Tumor:

Última consulta:.....

Local do tumor.....1ª Consulta:.....

TNM: Clínico.....Patológico.....

Tumor primário ( ) Sim ( ) Não Local:.....

Recidiva ( ) Sim ( ) Não Local:.....

Início do diagnóstico câncer: mês( ) ano ( ) Tipo:.....

Cirurgia.....Data.....

Fez radioterapia ( ) Sim ( ) Não Data/Período.....

Fez quimioterapia ( ) Sim ( ) Não Data/Período.....

### Fatores de Risco

#### Exposição ao tabaco (acima de 100 Cigarros/vida)

Início.....duração.....tipo.....consumo diário.....

#### Consumo de bebidas alcoólicas (acima de 4 doses por semana – 1garrafa de cerveja ou 2 latas)

Início.....duração.....tipo.....consumo semanal / tipo.....

**História Familiar de Neoplasias:**.....Herodograma no verso.

Responsável pela entrevista: .....

*MATERIAL SUPPLEMENTAR*

**Material Suplementar 1.** Resultados da análise estatística de 62 genes. O quadro mostra os valores de expressão relativa (RQ) dos tecidos de OSCC em relação aos tecidos não-tumorais adjacentes, os valores de P dos testes individuais (*One Sample T test* e *Wilcoxon signed rank test*) e após a correção de Benjamini e Hochberg (*Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*) dos genes investigados.

Gene	RQ	Valor P ( <i>two tailed</i> ) teste individual	Teste estatístico	Valor P' após correção para múltiplos testes	Valor P-Valor P'	Significancia estatística após correção para múltiplos testes *
CYP2J2	0,417788	0,0009	<i>One Sample T test</i>	0,00081	0,000094	Não significativa
PTGIS	0,347896	0,0010	<i>One Sample T test</i>	0,00161	-0,000613	Significante
CYP4F12	0,405658	0,0050	<i>One Sample T test</i>	0,00242	0,002581	Não significativa
CYP27A1	0,495203	0,0064	<i>One Sample T test</i>	0,00323	0,003174	Não significativa
CYP4X1	0,463871	0,0082	<i>One Sample T test</i>	0,00403	0,004168	Não significativa
CYP2E1	0,511053	0,0091	<i>One Sample T test</i>	0,00484	0,004261	Não significativa
MAOB	0,188230	0,0156	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,00565	0,009955	Não significativa
CYP4B1	0,085118	0,0234	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,00645	0,016948	Não significativa
CYP2R1	0,547161	0,0276	<i>One Sample T test</i>	0,00726	0,020342	Não significativa
Alox12	0,303400	0,0391	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,00806	0,031035	Não significativa
CYP27B1	1,926849	0,0391	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,00887	0,030229	Não significativa
CYP2U1	0,608638	0,0425	<i>One Sample T test</i>	0,00968	0,032823	Não significativa
SC4MOL	2,138657	0,0547	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,01048	0,044216	Não significativa
CYP27C1	2,731116	0,0814	<i>One Sample T test</i>	0,01129	0,070110	Não significativa
MAOA	0,718385	0,0829	<i>One Sample T test</i>	0,01210	0,070803	Não significativa
Alox3	4,204977	0,0872	<i>One Sample T test</i>	0,01290	0,074297	Não significativa
FMO1	0,694242	0,0873	<i>One Sample T test</i>	0,01371	0,073590	Não significativa

CYP24A1	2,874672	0,1094	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,01452	0,094884	Não significativa
TPH1	0,636231	0,1129	<i>One Sample T test</i>	0,01532	0,097577	Não significativa
CYP4F11	4,132456	0,1253	<i>One Sample T test</i>	0,01613	0,109171	Não significativa
FMO2	0,593212	0,1466	<i>One Sample T test</i>	0,01694	0,129665	Não significativa
SQLE	3,120876	0,1484	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,01774	0,130658	Não significativa
CYB5B	1,203996	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,01855	0,176752	Não significativa
CYP1B1	0,489727	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,01935	0,175945	Não significativa
CYP2C19	0,107579	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02016	0,175139	Não significativa
CYP2D6	0,343330	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02097	0,174332	Não significativa
CYP4Z1	0,164686	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02177	0,173526	Não significativa
CYP51A1	1,412725	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02258	0,172719	Não significativa
FMO5	0,546900	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02339	0,171913	Não significativa
PAM	0,433128	0,1953	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02419	0,171106	Não significativa
CYP4V2	0,672156	0,2236	<i>One Sample T test</i>	0,02500	0,198600	Não significativa
CYB5R1	1,810715	0,2447	<i>One Sample T test</i>	0,02581	0,218894	Não significativa
BCMO1	0,284819	0,2500	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02661	0,223387	Não significativa
CYB5R2	1,536681	0,2500	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02742	0,222581	Não significativa
CYP2C9	0,120771	0,2500	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02823	0,221774	Não significativa
PGRMC1	0,481610	0,2500	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,02903	0,220968	Não significativa
CYP2A6	2,262462	0,2539	<i>One Sample T test</i>	0,02984	0,224061	Não significativa
CYP2B6	1,490196	0,2567	<i>One Sample T test</i>	0,03065	0,226055	Não significativa
FLAD1	1,946282	0,2993	<i>One Sample T test</i>	0,03145	0,267848	Não significativa
CYP3A4	0,651132	0,3131	<i>One Sample T test</i>	0,03226	0,280842	Não significativa
CYP26B1	1,393852	0,3295	<i>One Sample T test</i>	0,03306	0,296435	Não significativa
CYP4F22	0,689542	0,3828	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,03387	0,348929	Não significativa

CYP2W1	0,741172	0,4253	<i>One Sample T test</i>	0,03468	0,390623	Não significativa
DOHH	0,822839	0,4524	<i>One Sample T test</i>	0,03548	0,416916	Não significativa
POR	1,156876	0,5096	<i>One Sample T test</i>	0,03629	0,473310	Não significativa
CYP39A1	1,074279	0,5469	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,03710	0,509803	Não significativa
CYP2S1	1,229986	0,5682	<i>One Sample T test</i>	0,03790	0,530297	Não significativa
FDX1	1,326767	0,6066	<i>One Sample T test</i>	0,03871	0,567890	Não significativa
CYP5R4	0,934229	0,6406	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,03952	0,601084	Não significativa
CYB5R3	0,763321	0,7422	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04032	0,701877	Não significativa
CYP19A1	0,543139	0,7422	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04113	0,701071	Não significativa
CYP8B1	0,973379	0,7422	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04194	0,700265	Não significativa
PGRMC2	0,501554	0,7422	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04274	0,699458	Não significativa
CYP7B1	0,949856	0,7916	<i>One Sample T test</i>	0,04355	0,748052	Não significativa
FMO4	0,681444	0,8438	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04435	0,799445	Não significativa
TBXAS1	0,897138	0,8438	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04516	0,798639	Não significativa
CYP20A1	0,954113	0,8556	<i>One Sample T test</i>	0,04597	0,809632	Não significativa
Alox5	0,966930	0,8844	<i>One Sample T test</i>	0,04677	0,837626	Não significativa
FMO3	1,041262	0,9277	<i>One Sample T test</i>	0,04758	0,880119	Não significativa
FDXR	0,985235	0,9592	<i>One Sample T test</i>	0,04839	0,910813	Não significativa
CYP4F3	0,789347	10,0000	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,04919	9,950806	Não significativa
NENF	0,762274	10,0000	<i>Wilcoxon signed rank test</i>	0,05000	9,950000	Não significativa

\* A significância estatística ocorre quando o valor de P dos testes individuais é menor que o valor de P' após a correção para múltiplos testes. A significância é confirmada apenas para o resultado negativo da subtração desses valores (Valor de P-Valor de P').