



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

---

**NAYARA FERNANDES PEDRO**

**METABOLISMO DE ESPÉCIES REATIVAS DE  
OXIGÊNIO EM CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL**

**São José do Rio Preto**  
**2016**

**Nayara Fernandes Pedro**

**Metabolismo de espécies reativas de oxigênio em  
carcinoma espinocelular de cavidade oral**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Matos Biselli Chicote

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

São José do Rio Preto  
2016

**Nayara Fernandes Pedro**

**Metabolismo de espécies reativas de oxigênio em  
carcinoma espinocelular de cavidade oral**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU**

**DE MESTRE**

Presidente e Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Matos  
Biselli Chicote

2º Examinador: Márcia Maria Urbanin Castanhole -  
Nunes

3º Examinador: Anelise Russo

Suplentes: Érika Cristina Pavarino

Joice Matos Biselli Périco

São José do Rio Preto, 24/10/2016.

Pedro, Nayara Fernandes

Metabolismo de espécies reativas de oxigênio em carcinoma espinocelular de cavidade oral.

São José do Rio Preto, 2016.

93 p

Dissertação (Mestrado) – 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>. Patrícia Matos Biselli Chicote

1. estresse oxidativo 2. antioxidantes 3. carcinoma de células escamosas  
4. cavidade oral 5. carcinógenos

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Casuística e Métodos.....	8
2.1. Considerações Éticas.....	9
2.2. Caracterização das amostras.....	9
2.2.1. Classificação dos tumores malignos (TNM).....	11
2.3. Análises Moleculares.....	13
2.3.1. Extração de RNA Total.....	13
2.3.2. Síntese de DNA Complementar.....	14
2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq) em Tempo Real.....	15
2.3.4. Análise da Expressão Gênica pelo ensaio <i>TaqMan</i> ® <i>Array Human Antioxidant Mechanisms</i> .....	16
2.4. Identificação dos Processos Biológicos relacionados aos genes diferencialmente expressos.....	17
2.5. Análise Estatística.....	18
3. Resultados.....	19
4. Discussão.....	25

5. Conclusões.....	45
6. Referências Bibliográficas.....	47
Anexos.....	75
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
Anexo 2. Questionário.....	77
Anexo 3. Esquemas dos Processos Biológicos.....	78
3.1.    Biossíntese de Esteróides.....	78
3.2.    Carcinogênese Química.....	79
3.3.    Detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	80
3.4.    Doença Priônica.....	81
3.5.    Metabolismo do Ácido Araquidônico.....	82
3.6.    Metabolismo de Drogas por Citocromo P450.....	83
3.7.    Metabolismo da Glutathione.....	84
3.8.    Metabolismo da Tirosina.....	85
3.9.    Metabolismo do Triptofano.....	86
3.10.   Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	87
3.10.1. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	87
3.10.2. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	88
3.10.3. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	89
3.10.4. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	90
3.10.5. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450.....	91
3.11.   Síntese do Hormônio Tireoidiano.....	92
3.12.   Via de Sinalização FoxO.....	93

## DEDICATÓRIA

***Aos meus pais Wanda e Domingos.***

*Pela oportunidade de viver, por todo amor e atenção que dedicaram a mim, cada qual expressando da sua maneira. Obrigada mãe por sempre me apoiar em minhas escolhas. Dedico a vocês com todo o meu amor.*

***À minha irmã Alana.***

*Por estar sempre ao meu lado quando mais preciso e me apoiar nas mais diversas situações da vida, apesar das nossas diferenças. Eu a amo muito.*

***À minha avó Elídia.***

*Por ser exemplo de vida, me ensina a não desistir dos meus ideais mesmo diante das dificuldades. Eu a amo muito e tenho muito orgulho de ser sua neta.*

***Ao meu querido tio Alfredo (in memoriam).***

*Por todo o amor que dedicou a mim enquanto viveu.*

***Às minhas primas Marta Cristina, Maria Angélica e Maria do Carmo.***

*Por todo carinho e paciência, sempre dispostas a me ajudar a concretizar meus sonhos, além de proverem mais alegria em minha vida. Eu as amo muito.*

***Às minhas tias Maria Augusta, Maria Amélia, Terezinha, Weida e Wanilda.***

*Por todo carinho, preocupação e incentivo. Todas fazem parte da minha formação como pessoa e profissional por meio dos seus exemplos de determinação, garra e coragem com que enfrentam os desafios da vida. Cada uma tem espaço reservado em meu coração.*

***Às minhas amigas Flávia, Kátia e Natália.***

*Por todo apoio, carinho e conselhos. Apesar da distância física ou à falta de tempo, nossa amizade persiste e se renova, pois é verdadeira. Tenho muito amor por cada uma de vocês.*

## AGRADECIMENTOS

### ***A Deus***

*Por me conceder a minha vida e a de todos que amo a cada amanhecer. Obrigada Pai Celestial por mais essa vitória!*

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

*Por acreditar no potencial da pesquisa científica desta instituição de ensino.*

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

*Por todo o suporte, orientação e incentivo dos funcionários deste setor.*

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

*Por me proporcionar a oportunidade de poder ingressar na pesquisa científica e ser meu porto seguro diante das incertezas e dificuldades. A sua sabedoria e segurança em conduzir todas as etapas do estudo foram fundamentais e indispensáveis para a conquista deste título. Muito obrigada por todos os momentos de aprendizado, atenção e carinho! Deus abençoe cada vez mais você e a sua família.*

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

*Por me dar a oportunidade de participar e auxiliar na conquista deste sonho. Peço a Deus que a ilumine sempre para que continue a ser a luz para os jovens que como eu almejam adentrar a porta do conhecimento e da Ciência. Muito obrigada!*

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

*Por todo o auxílio e incentivo que me proporcionou durante todo o período deste estudo, além de nos socorrer nos momentos críticos e determinantes do trabalho. Muito obrigada!*

### ***À Profa. Dra. Rosa Sayoko Kawasaki Oyama***

*Por toda atenção, compartilhamento de conhecimento e auxílio que me proporcionou no desdobramento deste trabalho, além de gentilmente sugerir conselhos nos momentos*



*de dúvida, os quais foram importantes para que este fosse bem sucedido. Muito obrigada!*

***A Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas, Profa. Ma. Greiciane Florim e Profa. Dra. Camila Mazeti Felício***

*Por nos conceder gentilmente o uso de equipamentos e utensílios de laboratório, além do espaço físico quando não podíamos contar com o da UPGEM, o que foi fundamental para a execução da etapa prática e, portanto, para a conclusão deste trabalho.*

***À Profa. Dra. Anelise Russo***

*Muito obrigada por ter compartilhado comigo os seus conhecimentos e, mais do que isso, momentos importantes na sua trajetória profissional/acadêmica. A sua amizade, exemplo e a confiança que depositou em mim foram muito importantes no desenvolvimento deste projeto.*

***À mestranda Bruna F. D. Andrade***

*Por todo auxílio e por ter compartilhado comigo os seus conhecimentos. Você se tornou para mim uma grande amiga! Muito obrigada!*

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

*Agradeço a todos(as) que vivenciaram comigo esta importante etapa da minha vida. A companhia e o auxílio de cada um foi indispensável não somente para a realização deste trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal, humano. Desejo sucesso a todos(as)!*

***Aos Funcionários da UPGEM: Carol, Daniela e Lennon***

*Por todo auxílio, disponibilidade, paciência e atenção que me proporcionaram. Muito obrigada!*

***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, auxiliares de enfermagem, anestesistas e circulantes pelo auxílio que prestaram na obtenção das amostras.*

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

*A todos os funcionários do setor que participaram do processamento e na microdissecção das amostras. Em especial o Dr. Dalísio, patologista responsável pela análise microscópica das amostras, à sua secretária Dinha por toda atenção e gentileza e também ao Darley que com toda simpatia me auxiliou na busca de lâminas e blocos.*

***Aos pacientes do ambulatório da FUNFARME/FAMERP***

*Por aceitarem participar da pesquisa autorizando a coleta de fragmentos da resecção do tumor e que atenciosamente responderam ao questionário.*

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

*Pela bolsa concedida.*

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

*Pela disponibilidade em participar da banca e por todas as contribuições sugeridas para a melhoria do presente trabalho.*

## EPÍGRAFE

*“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine.*

*E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria [...].”*

*São Paulo, primeira carta aos Coríntios 13: 1-2*

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de execução experimental do estudo.....11
- Figura 2.** Mapa do ensaio *TaqMan® Array Human Antioxidant Mechanisms* contendo a relação dos genes analisados, sendo 84 genes envolvidos no processo de antioxidação e 12 genes endógenos (*housekeeping genes*) representados na linha A, colunas 1 a 12.....17
- Figura 3.** Genes que apresentaram expressão elevada em CEC oral. Os valores de RQ estão representados em escala logarítmica de base 2. Whiskers plot (min. to max.). Calibrador (tecidos não tumorais)  $\log RQ = 0$ .....22
- Figura 4.** Genes que apresentaram expressão reduzida em CEC oral. Os valores de RQ estão representados em escala logarítmica de base 2. Whiskers plot (min. to max.). Calibrador (tecidos não tumorais)  $\log RQ = 0$ .....22

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b> Caraterísticas clínicas e sociodemográficas dos pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral.....	10
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos tumores de acordo com TNM.....	12
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos tumores de cavidade oral de acordo com TNM.....	13
<b>Tabela 4.</b> Genes diferencialmente expressos em CEC oral por <i>One Sample T Test</i> .....	20
<b>Tabela 5.</b> Genes diferencialmente expressos em CEC oral por <i>Wilcoxon Signed Rank Test</i> .....	21
<b>Tabela 6.</b> Informações dos genes diferencialmente expressos nos tumores de cavidade oral.....	23
<b>Quadro 1.</b> Processos Biológicos relacionados aos genes diferencialmente expressos.....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Protein kinase B
<i>ALOX12</i>	Arachidonate 12-Lipoxygenase, 12S Type
<i>ATOX1</i>	Antioxidant 1 Copper Chaperone
CAPES	Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel
CEC	Spinocellular Carcinoma or Squamous Cell Carcinoma
CEC oral	Spinocellular Carcinoma of Oral Cavity or Squamous Cell Carcinoma of Oral Cavity
CEP- FAMERP	São José do Rio Preto Medical School Ethics Committee on Human Research
Cq	Quantification Cycle
<i>CSDE1</i> ou Unr	Cold Shock Domain Containing E1 or Up Stream of N-ras
CYP450	Cytochrome P450
CYPs	Cytochrome P450
DEPC	Diethylpyrocarbonate
<i>DHCR24</i>	24-Dehydrocholesterol Reductase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNAc	Complementary DNA
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
<i>DUOX1</i>	Dual oxidase 1
<i>DUOX2</i>	Dual oxidase 2
EGF	Epidermal Growth Factor
<i>EPHX2</i>	Epoxide Hidrolase 2
ErbB-2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERK 1 e 2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2
EROs ou ROS	Reactive Oxygen Species

FAMERP	São José do Rio Preto Medical School
Fas	Fas Cell Surface Death Receptor
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FoxO	Forkhead Box O
FUNFARME	Regional Medical School Foundation of São José do Rio Preto
GSH	Reduced Glutathione
GO	Glutathione Oxidase
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GPx	Glutathione Peroxidase
GPX3	Glutathione Peroxidase 3
Grx	Glutaredoxin
GRLX2	Glutaredoxin 2
GSR ou GR	<i>Glutathione Reductase</i>
GSSG	Glutathione disulfide
GSSeSG	Selenodiglutathione
GSSeH	Gluthathioselenol
GST	Glutathione S-Transferase
GSTZ1	Glutathione S-transferase zeta 1
H <sub>2</sub> O	Water
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen Peroxide
HeLa	Immortal cell line derived from cervical cancer cells
12(S)-HETE	5Z,8Z,10E,14Z)-(12S)-12-Hydroxyicosa-5,8,10,14-tetraenoic acid
H-Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF-1	Insulin like growth factor 1
INCA	Brazilian National Cancer Institute

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK	Mitogen-activated protein kinase / extracellular signal regulated kinase kinase kinase
MGB	Minor Groove Binder
<i>MGST3</i>	Microsomal glutathione S-transferase 3
MMP-9	Matrix Metaloproteinase 9
MNK/ATP7A	ATPase Copper Transporting Alpha
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
Nrf-2	Nuclear Factor Erythroid-derived 2-Like 2
O <sub>2</sub>	Oxygen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxide
OSCC	Oral Squamous Cells Carcinoma
<i>OXR1</i>	Oxidation Resistance 1
<i>OXSRI</i> ou <i>OSRI</i>	Oxidative-Stress Responsive 1
p21	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A
PCRq	Real Time Polimerase Chain Reaction Quantification
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKB/Akt	Protein kinase B
PRDX	Peroxiredoxin
<i>PRDX4</i>	Peroxiredoxin 4
PrP <sup>c</sup>	Cellular Prion Protein
<i>PRPN</i>	Prion Protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog



Raptor	Regulatory-Associated Protein of mTOR
Ref-1	Redox Factor-1
RefSeq	NCBI Reference Sequence Database
RELT	Receptor Expressed in Lymphoid tissues
RNAm	Messenger RNA
RQ	Relative Quantitation
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sEH	Epoxide Hydrolase, soluble
SOD	Superoxide Dismutase
<i>SOD1</i> ou <i>Cu/Zn - SOD</i>	Superoxide Dismutase 1 or Copper-Zinc Superoxide Dismutase
<i>SOD2</i> ou <i>MnSOD</i>	Superoxide Dismutase 2 or Manganese Superoxide Dismutase
<i>SOD3</i> ou <i>EC-SOD</i>	Superoxide Dismutase 3, Extracellular
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TCLE	Free and Informed Consent Form
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF - $\alpha$	Tumor Necrosis Factor – alfa
TNM	Extent of the tumor (T), the extent of spread to the lymph nodes (N), and the presence of metastasis (M)
TPO	Thyropoxidase
UICC	Union International Control Cancer
UPGEM	Genetics and Molecular Biology Research Unit
UNIPROT	Universal Protein Resource
WNK 1	With no (K) lysine kinase
°C	Degree Celsius
min	Minute

g	Gram
mg	Milligram
mL	Millilitre
nm	Nanogram
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
$\mu$ L	Microliter
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ g	Microgram
$\lambda$	Lambda

## RESUMO

**Introdução:** A suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço é modulada por fatores ambientais e genéticos. Cerca de 90% destes tumores são classificados como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, que se desenvolve nas superfícies mucosas do trato aéreo digestivo superior. Alterações no mecanismo de biotransformação de compostos exógenos podem resultar na geração de substâncias nocivas e predispor à malignização celular. Espécies reativas de oxigênio (EROs) resultam do metabolismo biotransformativo realizado por enzimas antioxidantes. Alterações na expressão ou na atividade dessas enzimas podem levar ao aumento de EROs intra e extracelular, que são capazes de promover danos oxidativos à célula, mutações no DNA e desequilíbrio na homeostase celular, que convergem em estados patológicos como o câncer. **Objetivo:** O presente estudo avaliou a expressão de genes envolvidos no metabolismo antioxidante (Fase II) de compostos exógenos em carcinoma espinocelular de cavidade oral (CEC oral). **Casuística e Métodos:** Foram analisadas oito amostras de CEC oral e oito tecidos não tumorais adjacentes. A quantificação da expressão de 84 genes envolvidos no sistema de antioxidação foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real utilizando o kit *TaqMan Array Human Antioxidant Mechanisms (Applied Biosystems)*. As análises estatísticas foram realizadas por *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*, *One-sample T test*, *Wilcoxon signed rank test*, *Two-sample T Test* e *Mann-Whitney test*. **Resultados:** Vinte e um genes apresentaram expressão diferencial em CEC oral ( $P < 0,05$ ). Quatro genes exibiram expressão elevada (*ATOX1*, *PRDX4*, *PRNP* e *SOD2*) e dezessete expressão reduzida (*ALOX12*, *CAT*, *CSDE1*, *DHCR24*, *DUOX1*, *DUOX2*, *EPHX2*, *GLRX2*, *GPX3*, *GSR*, *GSTZ1*, *MGST3*, *PRDX1*, *OXR1*, *OXSRI*, *SOD1* e

*SOD3*). Os genes diferencialmente expressos estão relacionados a processos biológicos envolvidos na carcinogênese, tais como inflamação, angiogênese, apoptose, instabilidade genômica, invasão, sobrevivência e proliferação celular, e podem contribuir para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cavidade oral. A expressão gênica não apresentou associação com os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores. **Conclusão:** Genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de antioxição de compostos exógenos apresentam expressão diferencial em CEC oral. Alterações na expressão desses genes podem modular processos biológicos relacionados à detoxificação de compostos tóxicos à célula e predispor à malignização celular na cavidade oral.

**Palavras chave:** estresse oxidativo, antioxidantes, carcinoma de células escamosas, cavidade oral, carcinógenos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Susceptibility for head and neck cancer is modulated by environmental and genetics factors. About 90% of these tumors are classified as head and neck squamous cells carcinoma which develops in the mucosal surface of the upper aero digestive tract. Alteration of the biotransformation mechanism of exogenous compounds can result in production of damaging substances and predispose to malignant cell development. Reactive oxygen species (ROS) are the result of biotransformation metabolism performed by antioxidant enzymes. Alteration of the expression or activity of these enzymes can lead to the increase of intra and extracellular ROS, which are able to promote oxidative damage in the cell, DNA mutation and disequilibrium of the cellular homeostasis which converge in pathological conditions such as cancer. **Objectives:** The present study evaluated the expression of genes involved in Phase II metabolism of exogenous compounds in oral squamous cells carcinoma (OSCC). **Casuistic and Methods:** Eight samples of OSCC and adjacent non tumor tissues were analyzed. The relative quantification of 84 genes involved in the antioxidant system was performed by quantitative real time Polymerase Chain Reaction in Real Time using the *TaqMan Array Human Antioxidant Mechanisms (Applied Biosystems)*. Statistical analyses were performed using *D'Agostino & Pearson omnibus normality test, One-sample T test, Wilcoxon signed rank test, Two-sample T Test and Mann-Whitney test*. **Results:** Twenty-one genes presented differential expression in OSCC ( $P < 0.05$ ). Four genes exhibited high expression (*ATOX1, PRDX4, PRNP* and *SOD2*) and seventeen genes presented reduced expression (*ALOX12, CAT, CSDE1, DHCR24, DUOX1, DUOX2, EPHX2, GLRX2, GPX3, GSR, GSTZ1, MGST3, PRDX1, OXR1, OXSRI, SOD1* and *SOD3*).

The differential expressed genes are related to biological processes involved in carcinogenesis, such as inflammation, angiogenesis, apoptosis, genomic instability, invasion, survival and cell proliferation. Gene expression was not associated to clinic and pathologic parameters of the tumors. **Conclusion:** Genes encoding enzymes involved in the antioxidant metabolism of exogenous compounds present differential expression in OSCC. Alteration in the expression of these genes can modulate biological processes related to detoxification of toxic compound and predispose to malignant cell growth in the oral cavity.

**Palavras chave:** oxidative stress, antioxidants, carcinoma squamous cell, oral cavity, carcinogens.

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

Comumente conhecido como câncer de cabeça e pescoço, o carcinoma espinocelular ou de células escamosas (CEC) compreende uma variedade de tumores epiteliais nas superfícies mucosas do trato aéreo digestivo superior situado na cavidade oral, orofaringe, nasofaringe e laringofaringe.<sup>(1)</sup>

De acordo com GLOBOCAN (2012), a incidência mundial de câncer de cabeça e pescoço em homens foi de 513.104 casos e 173.224 em mulheres.<sup>(2)</sup> No Brasil, para o ano de 2016 estima-se 11.140 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Entre os tipos de câncer mais frequentes, exceto câncer de pele não melanoma, o câncer de cavidade oral ocupa o quinto lugar em homens e o décimo segundo lugar em mulheres.<sup>(3)</sup>

O surgimento de tumores de cabeça e pescoço possui etiologia multifatorial e está associado a fatores hereditários e ambientais.<sup>(4-7)</sup> O consumo de álcool e cigarro são fatores etiológicos já conhecidos para o desenvolvimento dessa patologia.<sup>(5, 6, 8 - 10)</sup> Com mais de 70 agentes carcinogênicos, o cigarro é responsável por causar mutações celulares e hiperplasia difusa da mucosa do trato aéreo digestivo superior promovendo o crescimento celular alterado causado pela interação entre as N-nitrosaminas e aminas aromáticas com o DNA, que resulta na formação de adutos.<sup>(11,12)</sup>

Assim como o cigarro, o álcool interage com o DNA e componentes celulares por meio de seu metabólito primário acetaldeído, cuja alta reatividade também leva à formação de adutos estáveis de DNA.<sup>(13-15)</sup> O consumo excessivo de álcool pode acarretar deficiências nutricionais em razão de constantes falhas na absorção intestinal e alterações em vias metabólicas.<sup>(16)</sup> O uso concomitante de cigarro e álcool leva a



inibição de diversas isoformas da família Citocromo P450 (CYP450), o que impede a ativação e posterior excreção de moléculas nitrosaminas liberadas pelo cigarro <sup>(17,18)</sup>

A superfamília CYP450 constitui a principal família de enzimas capaz de catalisar a biotransformação oxidativa da maioria das drogas, bem como outros compostos químicos exógenos lipofílicos. <sup>(19,20)</sup> As enzimas CYP450 e Epóxido Hidrolase (EPHX) participam do metabolismo de Fase I, na qual catalisam a oxidação de substratos e, eventualmente, reações de redução. Compostos intermediários resultantes do metabolismo dependente de CYPs, que com frequência exercem efeito tóxico ou carcinogênico, são posteriormente inativados por reações de conjugação dependentes de enzimas de Fase II. <sup>(21)</sup>

Entre as enzimas de Fase II destaca-se a família Glutathione S-Transferases (GST) composta por oito componentes distintos em relação à propriedade imunológica, estrutura e substrato específico. <sup>(22)</sup> Polimorfismos identificados em genes GST sugerem predisposição ao desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. <sup>(23)</sup>

As enzimas CYPs são fundamentais na bioativação de carcinógenos e quimioterápicos, e, por sua vez, têm papel importante na etiologia do câncer e nas terapias que o combatem. <sup>(24,25)</sup> Como resultado do consumo do cofator fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) pelas CYPs microsossomais, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), independente da presença de substratos. <sup>(26)</sup>

EROs podem ser tanto radicais livres como derivados não radicais de oxigênio. A maioria das EROs são geradas como subprodutos do transporte de elétrons na mitocôndria e em reações de oxidação catalisadas por intermediários de metais. <sup>(27)</sup>

Entretanto, as EROs também se formam mediante exposição a agentes ambientais, tais como xenobióticos, carcinógenos não genotóxicos, ultrassom e radiação.<sup>(28)</sup>

As EROs aliam-se a moléculas sinalizadoras, cujos mecanismos moleculares responsáveis por esta interação são importantes na sinalização de vários processos celulares, tais como proliferação e sobrevivência, cascata da proteína quinase mitógeno ativada (MAPK), via do fosfoinosítide-3-quinase (PI3K), homeostase de EROs e de genes antioxidantes (Ref-1 e Nrf-2).<sup>(29)</sup>

O estresse oxidativo ocorre quando as EROs não são adequadamente neutralizadas ou removidas e está associado à mudança no equilíbrio intracelular EROs /antioxidantes.<sup>(30)</sup> Este desequilíbrio acarreta excesso de EROs causadores de danos no DNA por meio da formação de compostos mutagênicos, além de ativar proto-oncogenes e desativar genes supressores tumorais.<sup>(31)</sup>

Doenças como aterosclerose, Parkinson e Alzheimer e câncer são patologias intrinsecamente relacionadas ao desequilíbrio da homeostase celular ocasionado pelo estresse oxidativo, processo precursor de fisiopatologias como inflamação, apoptose, angiogênese e envelhecimento celular.<sup>(32,33)</sup>

Em câncer oral, as EROs foram relacionadas ao desenvolvimento tumoral em indivíduos fumantes.<sup>(34,35)</sup> Além disso, estudos demonstraram intensa produção de radicais livres em células epidérmicas de carcinoma oral humano *in vitro* em resposta ao tabaco.<sup>(36)</sup> O estresse oxidativo está associado com câncer da cavidade oral quando as defesas antioxidantes são comprometidas. O acúmulo de constantes danos endógenos ao DNA celular por meio de radicais livres gerados pelo uso do tabaco desempenha importante papel na carcinogênese oral.<sup>(37)</sup>

O ciclo de oxidorredução dos compostos polihidroxilados catalisado pelas enzimas CYP pode resultar na geração de radicais superóxido ( $O_2^-$ ). Os níveis intra e extracelulares de superóxido são controlados pela família das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), que o reduz em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular.<sup>(38)</sup>

Assim como as enzimas SOD, outras enzimas e agentes compõem um sistema antioxidante capaz de combater outras espécies reativas formadas no processo de oxidorredução. As enzimas catalase (CAT), peroxirredoxinas (PRDX), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) são os principais antioxidantes enzimáticos diretamente envolvidos na neutralização do peróxido de hidrogênio, transformando-o em água e oxigênio.<sup>(39)</sup> O sistema antioxidante também é composto por agentes não enzimáticos provenientes da dieta, como as vitaminas (A, C e E), flavonóides, selênio, manganês, zinco, cobre, ácido úrico, ferritina, bilirubina, albumina, transferrina, ceruplasmina e glutathione (GSH).<sup>(40)</sup>

A GSH é um composto tiol não proteico que participa da detoxificação de EROs e compostos exógenos e endógenos, controle da proliferação e morte celular, síntese e reparo do DNA, regulação da síntese proteica, síntese de prostaglandinas, transporte de aminoácidos e ativação enzimática.<sup>(21)</sup> O desequilíbrio de GSH celular está relacionado a estados patológicos, uma vez que esse composto participa da regulação da resposta celular a várias condições de estresse que incluem a regulação positiva ou negativa da biossíntese de GSH e alterações em transportadores de membrana que participam da distribuição de GSH nas células e tecidos.<sup>(33)</sup>

Enzimas envolvidas na via metabólica de GSH são importantes para o processo de antioxidação. GSH é utilizada como doador de elétrons em reações envolvendo a

enzima GPx ou é oxidada por GSH oxidases (GO) e, então, reduzida pelas enzimas GR, utilizando NADPH como doador de elétrons. <sup>(39)</sup> A conjugação de GSH com a Glutathione S-Transferase (GST) a torna hábil para transportar, a partir do ambiente extracelular ou do metabolismo de desintoxicação intracelular, uma variedade de moléculas genotóxicas causadoras de danos celulares. <sup>(41)</sup> Várias isoenzimas de GST estão envolvidas na sinalização celular, interferindo, por exemplo, na sinalização da cascata MAPK responsável pela regulação do ciclo, proliferação e morte celular. <sup>(42)</sup>

Uma vez que as enzimas atuantes na via do estresse oxidativo e metabolização de compostos exógenos podem participar do processo de carcinogênese, considera-se que as mesmas desempenham função primordial na suscetibilidade individual à doença. <sup>(43)</sup> Alterações na expressão dessas enzimas podem indicar possíveis mecanismos no processo de carcinogênese desse tipo tumoral. <sup>(7)</sup>

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar a contribuição do metabolismo de espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cavidade oral.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de genes envolvidos no metabolismo antioxidante (Fase II) de compostos exógenos em carcinoma espinocelular de cavidade oral e comparar com tecidos não tumorais adjacentes.
2. Investigar a associação entre a expressão gênica e os parâmetros clínicos e histopatológicos do carcinoma espinocelular de cavidade oral.
3. Identificar os processos biológicos relacionados aos genes diferencialmente expressos em carcinoma espinocelular de cavidade oral.

# ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1. Considerações Éticas

O presente estudo 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 752.570. Este estudo está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

### 2.2. Caracterização das amostras

Dezesseis amostras, sendo oito de carcinoma espinocelular de cavidade oral (CEC oral) e oito tecidos não tumorais adjacentes de pacientes atendidos pelo Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base – Complexo FAMERP/FUNFARME, entre 2013 e 2015, foram incluídas no estudo, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Na Tabela 1 estão apresentadas as características clínicas e sociodemográficas dos pacientes. Dados como idade, sexo, hábitos tabagista e etilista, além dos dados clínicos do tumor foram obtidos por meio de questionário padronizado (Anexo 2).

Considerou-se como fumante o indivíduo que fumou >100 cigarros durante a vida e etilista aquele que consome mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor – 44 mL (1,5 OZ); copo de vinho – ~ 118 mL (4 OZ), contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja – ~ 350 mL (12 OZ)).<sup>(44,45)</sup>

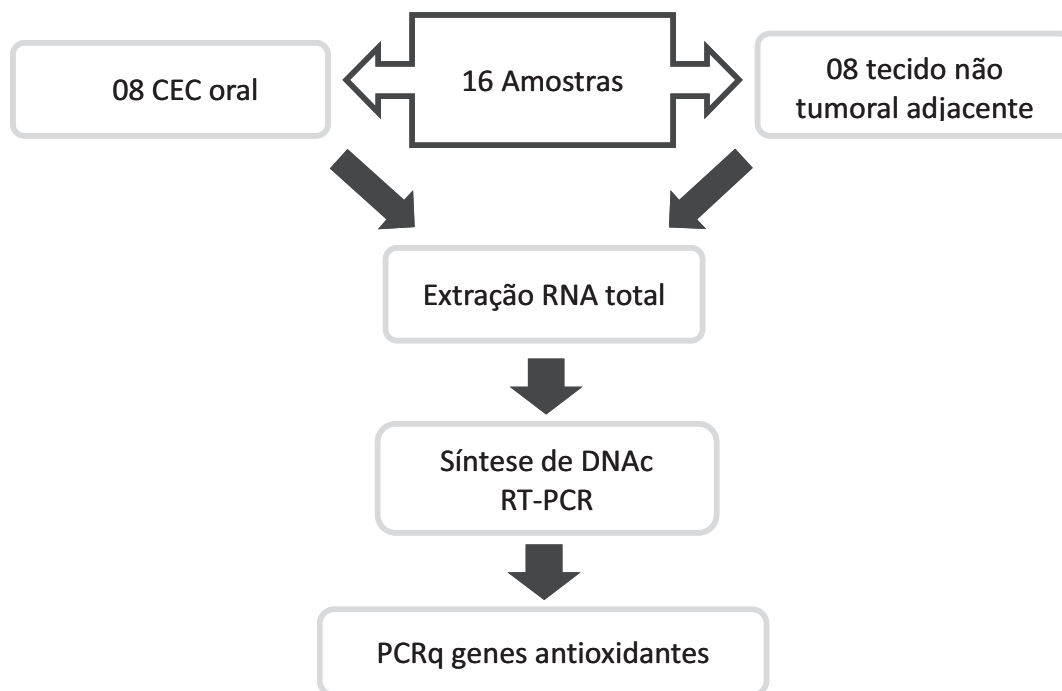
Após a coleta as amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à macrodissecção por médico patologista da equipe. Das oito amostras de CEC oral, cinco

correspondem ao sítio anatômico língua, duas a mucosa gengival e uma exérese de lesão em assoalho bucal e mucosa gengival. O planejamento da execução experimental do estudo está resumido no fluxograma de trabalho (Figura 1).

**Tabela 1.** Características clínicas e sociodemográficas dos pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral.

<b>Pacientes (n=08)</b>	
<b>Variáveis</b>	<b>n (%)</b>
<b>Idade (média ± DS)</b>	66,38 (±12,56)
<b>Gênero</b>	
Feminino	3 (37,5 %)
Masculino	5 (62,5 %)
<b>Tabagismo</b>	
Não	1 (12,5 %)
Sim	7 (87,5 %)
<b>Etilismo</b>	
Não	2 (25 %)
Sim	6 (75 %)
<b>Classificação T</b>	
T1 – T2	4 (50 %)
T3 – T4	4 (50 %)
<b>Classificação N</b>	
N0	7 (87,5 %)
N1, N2, N3	1 (12,5 %)
<b>Estadio</b>	
I e II	4 (50 %)
III e IV	4 (50 %)





**Figura 1.** Fluxograma de execução experimental do estudo.

### 2.2.1 Classificação dos tumores malignos (TNM)

O estadiamento dos tumores foi realizado de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer (UICC)* e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)*, em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M), de acordo com o sítio anatômico (Tabela 2).<sup>(46-48)</sup>

Os tumores foram divididos em tumores de pequena extensão (T1, T2) e grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). Em relação à categoria M, nenhum paciente apresentou metástase à distância. O estadiamento do tumor foi realizado de acordo com os estadios, nos quais os tumores foram classificados em não avançados

(estádios I e II) e avançados (III e IV). <sup>(46-48)</sup> A Tabela 3 apresenta os dados de estadiamento dos tumores incluídos no presente estudo.

**Tabela 2.** Classificação dos tumores de acordo com TNM.

<b>Estádio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
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
IVC	T4b	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Tabela 3.** Classificação dos tumores de cavidade oral incluídos no estudo de acordo com TNM.

<b>Amostra</b>	<b>TNM/Estadio</b>
1	T4N0M0 / IV
2	T3N0M0 / III
3	T4N0M0 / IV
4	T2N1M0 / II
5	T4N0M0 / IV
6	T1N0M0 / I
7	T2N0M0 / II
8	T1N0MX / I

X – não foi possível avaliar

## 2.3 Análises Moleculares

### 2.3.1 Extração RNA total

RNA das amostras de tecido tumoral e não tumoral foram extraídas utilizando-se o reagente *TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)* de acordo com as instruções do fabricante. A técnica consistiu inicialmente da maceração manual dos fragmentos de aproximadamente 100 mg de tecido em almofariz, com pistilo e adição de nitrogênio líquido. Para cada 50-100 mg de tecido, foi adicionado 1 mL de *TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)*. Em seguida, o material foi distribuído em microtubos de 1,5 mL e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. O próximo passo foi a adição de 200 µL de clorofórmio gelado para cada 1 mL de *TRIzol<sup>®</sup> Reagent*. O material foi agitado por aproximadamente 20 segundos e permaneceu por 3 minutos em temperatura ambiente

seguido de acondicionamento em gelo. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C para separação das fases aquosa (contendo RNA), interfase e fase orgânica. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de *TRIzol*<sup>®</sup> *Reagent* utilizado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram misturadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Após a evaporação do etanol, o *pellet* de RNA foi ressuscitado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (*Ambion*<sup>®</sup>) e incubado por 10 minutos a 60°C.

Posteriormente, as amostras de RNA foram submetidas à espectrofotometria para determinação de sua absorvância em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*) para quantificação da concentração e em seguida foram armazenadas em freezer -80°C.

### 2.3.2 Síntese de DNA complementar

A partir das amostras de RNA foi sintetizado o DNA complementar (DNAc) utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante. Em uma reação de 20  $\mu$ L, foram utilizados 2  $\mu$ g de RNA total, desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) *mix* 1X, RT random *primers* 1X, tampão 1X e 50 U de *Multiscribe Reverse Transcriptase*. Em termociclador, as reações foram realizadas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min.

### 2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (PCRq)

As reações de quantificação gênica foram realizadas em placas de 96 poços customizadas contendo sondas e oligonucleotídeos iniciadores para 84 genes codificadores de proteínas antioxidantes, no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). Foram utilizadas as sondas *TaqMan* MGB (*Minor groove binder*) ligadas ao fluoróforo FAM (*Applied Biosystems*).

A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi realizada pelo cálculo do  $\Delta Rn$  ( $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ ), onde  $Rn^+$  corresponde 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. O fluoróforo ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência emitida é constante durante toda a reação.

Os valores de  $\Delta Rn$  permanecem na linha de base durante os ciclos iniciais da reação, quando não há acúmulo de produtos de amplificação (fluorescência do ROX > FAM). Na fase logarítmica,  $\Delta Rn$  ultrapassa a linha de base como resultado do aumento dos produtos de amplificação. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de  $\Delta Rn$ , correspondente à linha de corte (*threshold*) para a curva de amplificação de cada gene estudado. O número do ciclo em que o  $\Delta Rn$  cruza a linha de corte corresponde ao ciclo de quantificação (Cq) da amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .<sup>(49)</sup> As amostras de tecido não tumoral adjacente foram utilizadas como calibrador.

Os valores de quantificação relativa (*Relative quantification - RQ*) foram calculados após ajuste manual do sinal basal de fluorescência e da linha de corte para cada gene analisado no programa *Expression Suite* versão 1.0.3. (*Applied Biosystems*).

#### **2.3.4 Análise da expressão gênica pelo ensaio *TaqMan*® *Array Human Antioxidant Mechanisms***

A expressão dos genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas de oxigênio foi quantificada por meio do kit *TaqMan*® *Array Human Antioxidant Mechanisms* (*Applied Biosystems*). Foi possível avaliar a expressão de 84 genes codificadores de proteínas antioxidantes (Figura 2), capazes de reduzir ou prevenir o processo oxidativo, incluindo peroxidases, peroxiredoxinas, genes de resposta ao estresse oxidativo, superóxidos dismutases, dentre outros. Esses genes participam do processo que neutraliza os efeitos deletérios dos subprodutos do oxigênio, por meio da remoção dos intermediários de radicais livres.

A quantificação da expressão gênica das amostras tumorais foi comparada à das amostras não tumorais (calibrador) e em relação aos genes de referência. As reações de amplificação foram realizadas com DNAc na concentração de 100 ng e 5 µL da *TaqMan*® *Master Mix Gene Expression* (*Applied Biosystems*) a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M	RPLP0	HMBS	TBP	PGK1	UBC	PPIA
B	ALB	ALOX12	ANGPTL 7	AOX1	APOE	ATOX1	BNIP3	CAT	CCL5	CCS	CSDE1	CYBA
C	CYGB	DGKK	DHCR24	DUOX1	DUOX2	DUSP1	EPHX2	EPX	FOXM1	GLRX2	GPR156	GPX1
D	GPX2	GPX3	GPX4	GPX5	GPX6	GPX7	GSR	GSS	GSTZ1	GTF2I	KRT1	LPO
E	MBL2	MGST3	MPO	MPV17	MSRA	MT3	MTL5	NCF1, NCF1B, NCF1C	NCF2	NME5	NOS2	NOX5
F	NUDT1	OXR1	OXSRI	PDLIM1	PIP3-E	PNKP	PRDX1	PRDX2	PRDX3	PRDX4	PRDX5	PRDX6
G	PREX1	PRG3	PRNP	PTGS1	PTGS2	PXDNL	PXDNL	RNF7	SCARA 3	SELS	SEPP1	SFTPD
H	SGK2	SIRT2	SOD1	SOD2	SOD3	SRXN1	STK25	TPO	TTN	TXNDC 2	TXNRD 1	TXNRD 2

**Figura 2.** Mapa do ensaio *TaqMan® Array Human Antioxidant Mechanisms* contendo a relação dos genes analisados, sendo 84 genes envolvidos no processo de antioxição e 12 genes endógenos (*housekeeping genes*) representados na linha A colunas 1 a 12.

#### 2.4. Identificação dos Processos Biológicos relacionados aos genes diferencialmente expressos

A investigação sobre os processos biológicos nos quais os genes que apresentaram expressão diferencial estão envolvidos foi realizada nas bases de dados *Gene – NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*, *UNIPROT (Universal Protein Resource)* e *REACTOME*. Também foi realizado levantamento bibliográfico no *PUBMED* para os genes que não apresentaram resultados nas bases de dados consultadas.

## 2.5 Análise Estatística

Primeiramente, os dados foram avaliados em relação à distribuição na curva de Gauss por meio do *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*. Os valores de *RQ* das amostras de CEC oral que apresentaram distribuição normal foram comparados ao *RQ* das amostras não tumorais ( $RQ = 1$ ) por *One sample T test*. Valores de *RQ* que não apresentaram distribuição normal foram analisados por *Wilcoxon Signed Rank Test*. *Two-sample T Test* ou *Mann-Whitney Test* foram utilizados para avaliação dos valores de expressão gênica em relação à progressão tumoral. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism v.5.1* e *StatsDirect v.2.7.2*. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.



## ***RESULTADOS***

---

### 3. RESULTADOS

Vinte e um genes apresentaram expressão diferencial significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tecidos de CEC oral e tecidos não tumorais adjacentes (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4.** Genes diferencialmente expressos em CEC oral por *One Sample T Test*.

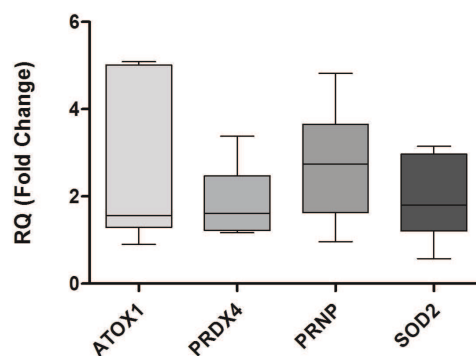
CEC Oral			
Gene	Média RQ	Desvio Padrão	Valor de P
<i>CAT</i>	0,641	0,2836	0,009
<i>CSDE1</i>	0,7387	0,301	0,0437
<i>GSR</i>	0,5737	0,315	0,0065
<i>PRDX1</i>	0,5133	0,2815	0,0018
<i>SOD1</i>	0,6272	0,2933	0,0088
<i>SOD2</i>	1,979	0,9456	0,0221

**Tabela 5.** Genes diferencialmente expressos em CEC oral por *Wilcoxon Signed Rank Test*.

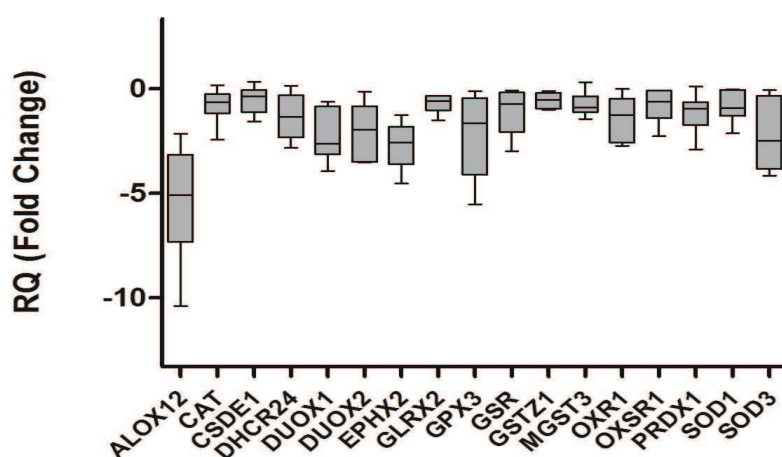
CEC Oral				
Gene	Mediana RQ	Percentil 25%	Percentil 75%	Valor de P
<i>ALOX12</i>	0,02908	0,006198	0,1117	0,0156
<i>ATOX1</i>	1,555	1,294	5,01	0,0313
<i>DHCR24</i>	0,3936	0,1993	0,796	0,0313
<i>DUOX1</i>	0,1604	0,1139	0,5525	0,0313
<i>DUOX2</i>	0,2549	0,0879	0,5616	0,0313
<i>EPHX2</i>	0,167	0,08193	0,2812	0,0313
<i>GLRX2</i>	0,6634	0,4882	0,7851	0,0313
<i>GPX3</i>	0,318	0,0584	0,7235	0,0156
<i>GSTZ1</i>	0,6931	0,515	0,8742	0,0313
<i>MGST3</i>	0,5337	0,4627	0,7727	0,0313
<i>OXR1</i>	0,4112	0,1689	0,7156	0,0313
<i>OXSRI</i>	0,6436	0,374	0,9278	0,0156
<i>PRDX4</i>	1,61	1,225	2,471	0,0313
<i>PRNP</i>	2,744	1,631	3,653	0,0313
<i>SOD3</i>	0,178	0,07066	0,7852	0,0313

Destes 21 genes, quatro exibiram expressão elevada ( $RQ > 1$ ) e os demais genes apresentaram expressão reduzida ( $RQ < 1$ ) nos tumores de cavidade oral (Figuras 3 e 4). A Tabela 4 mostra as informações sobre os genes diferencialmente expressos.

A expressão gênica não apresentou associação com os parâmetros clínicos dos tumores (extensão e progressão tumoral) ( $P > 0,05$ ). Não foi possível a realização da análise estatística em relação ao comprometimento de linfonodos, uma vez que somente um paciente apresentou essa característica clínica. Nenhum paciente apresentou metástase à distância.



**Figura 3.** Genes que apresentaram expressão elevada em CEC oral. Os valores de RQ estão representados em escala logarítmica de base 2. *Whiskers plot* (min. to max.). Calibrador (tecidos não tumorais)  $\log RQ = 0$ .



**Figura 4.** Genes que apresentaram expressão reduzida em CEC oral. Os valores de RQ estão representados em escala logarítmica de base 2. *Whiskers plot* (min. to max.). Calibrador (tecidos não tumorais)  $\log RQ = 0$ .

**Tabela 6.** Informações dos genes diferencialmente expressos em CEC oral.

<b>Símbolo</b>	<b>Nome do Gene</b>	<b>Localização cromossômica</b>	<b>Gene ID</b>	<b>UniGene</b>
<i>ALOX12</i>	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S type</i>	17p13.1	239	Hs.654431
<i>ATOX1</i>	<i>Antioxidant 1copper chaperone</i>	5q32	475	Hs.125213
<i>CAT</i>	<i>Catalase</i>	11p13	847	Hs.502302
<i>CSDE1</i>	<i>Cold shock domain containing E1</i>	1p22	7812	Hs.69855
<i>DHCR24</i>	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>	1p32.3	1718	Hs.498727
<i>DUOX1</i>	<i>Dual oxidase 1</i>	15q15.3	53905	Hs.272813
<i>DUOX2</i>	<i>Dual oxidase 2</i>	15q15.3	50506	Hs.71377
<i>EPHX2</i>	<i>Epoxidehidrolase 2</i>	8p21	2053	Hs.212088
<i>GLRX2</i>	<i>Glutaredoxin 2</i>	1q31.2	51022	Hs.458283
<i>GPX3</i>	<i>Glutathione peroxidase 3 (plasma)</i>	5q33.1	2878	Hs.386793
<i>GSR</i>	<i>Glutathione-disulfide reductase</i>	8p21.1	2936	Hs.271510
<i>GSTZ1</i>	<i>Glutathione S-transferase zeta 1</i>	14q24.3	2954	Hs.655292
<i>MGST3</i>	<i>Microsomal glutathione S-transferase 3</i>	1q23	4259	Hs.191734
<i>OXR1</i>	<i>Oxidation Resistance 1</i>	8q23	55074	Hs.701892
<i>OXSRI</i>	<i>Oxidative-stress responsive 1</i>	3p22.2	9943	Hs.475970
<i>PRDX1</i>	<i>Peroxiredoxin 1</i>	1p34.1	5052	Hs.180909
<i>PRDX4</i>	<i>Peroxiredoxin 4</i>	Xp22.11	10549	Hs.83383
<i>PRNP</i>	<i>Prion protein</i>	20p13	102460857	Hs.472010
<i>SOD1</i>	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>	21q22.11	6647	Hs.443914
<i>SOD2</i>	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	6q25.3	6648	Hs.487046
<i>SOD3</i>	<i>Superoxidedismutase 3, extracellular</i>	4p15.2	6649	Hs.2420

Após análise por Bioinformática, 15 processos biológicos foram relacionados aos genes diferencialmente expressos (Quadro 1). Esquemas dos processos biológicos estão disponíveis no Anexo 3 (página 78) do presente trabalho.

**Quadro 1.** Processos Biológicos relacionados aos genes diferencialmente expressos.

<b>Processos Biológicos</b>	<b>Genes diferencialmente expressos</b>
Biossíntese de esteroides	<i>DHCR24</i>
Carcinogênese química	<i>MGST3</i>
Detoxificação de espécies reativas de oxigênio	<i>SOD3; SOD2; SOD1; ATOX1; PRDX1; CAT; GPX3; GSR; OXR1</i>
Doenças priônicas	<i>PRPN</i>
Fosforilação proteica	<i>OXSRI</i>
Metabolismo do ácido araquidônico	<i>EPHX2; GPX3; ALOX12</i>
Metabolismo de drogas por Citocromo P450	<i>MGST3</i>
Metabolismo da glutathiona	<i>GSR; MGST3; PRDX4; GPX3; GSTZ1</i>
Metabolismo de nucleotídeo	<i>GLRX2</i>
Metabolismo da tirosina	<i>GSTZ1</i>
Metabolismo do triptofano	<i>CAT</i>
Metabolismo de xenobióticos por Citocromo P450	<i>MGST3</i>
Regulação da transcrição gênica	<i>CSDE1</i>
Síntese do hormônio tireiodiano	<i>GSR; DUOX1; DUOX2; GPX3</i>
Via de sinalização FoxO	<i>SOD2; CAT</i>

***DISCUSSÃO***

---

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, vinte e um genes apresentaram expressão diferencial em CEC oral. Os genes diferencialmente expressos participam do mecanismo de controle do processo oxidativo que inclui peroxidases, peroxirredoxinas, genes de resposta ao estresse oxidativo e superóxido dismutases. Esses genes participam do processo de neutralização dos efeitos deletérios de subprodutos do oxigênio por meio da remoção de intermediários de radicais livres.<sup>(29)</sup>

Os genes que apresentaram expressão diferencial participam de quinze processos biológicos relacionados à carcinogênese, como a via de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (*SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *ATOX1*, *PRDX1*, *CAT*, *OXR1*), via da carcinogênese química (*MGTS3*), metabolismo de drogas pelas Citocromo P450 (*MGTS3*), metabolismo de xenobióticos pelas Citocromo P450 (*MGST3*), metabolismo da glutatona (*GSR*, *MGTS3*, *PRDX4*, *GPX3*, *GSTZ1*), metabolismo do ácido araquidônico (*EPHX2*, *GPX3*, *ALOX12*), via de sinalização FoxO (*SOD2*, *CAT*), metabolismo do triptofano (*CAT*, *DHCR24*) e tirosina (*GSTZ1*), biossíntese de esteróides (*DHCR24*), síntese do hormônio tireoidiano (*DUOX1*, *DUOX2*, *GSR*, *GPX3*), doenças priônicas (*PRPN*), metabolismo de nucleotídeo (*GLRX2*), regulação da transcrição gênica (*CSDE1*) e fosforilação proteica (*OXSRI*).

Enzimas que atuam na via do estresse oxidativo e metabolização de compostos exógenos podem participar do processo de carcinogênese, pois desempenham função primordial na suscetibilidade individual à doença, uma vez que são responsáveis pela ativação e detoxificação destes compostos.<sup>(43,50)</sup> O estresse oxidativo ocorre quando as espécies reativas não são adequadamente neutralizadas ou removidas e está associado à



mudança no equilíbrio intracelular EROs/antioxidantes,<sup>(30)</sup> que pode causar consequências deletérias para a homeostase celular e estar implicada em uma série de condições patológicas, como câncer, aterosclerose, envelhecimento e também em processos fisiopatológicos como inflamação, angiogênese e apoptose.<sup>(32,33,51)</sup>

O radical superóxido desempenha um papel central no estresse oxidativo e pode influenciar na produção de uma variedade de outras EROs. O aumento de EROs contribui para a instabilidade genômica, evento importante para o surgimento e progressão do câncer,<sup>(52,53)</sup> além disso elevados níveis de estresse oxidativo e dependência da sinalização anti-apoptótica e mitogênica de EROs estão envolvidos na carcinogênese.<sup>(54)</sup>

Os níveis intra e extracelulares de EROs são, por sua vez, controlados por enzimas, tais como catalase, glutathione peroxidase, peroxirredoxina, glutathione e superóxido dismutase, além de íons magnésio e zinco, vitaminas C e E, cofatores NADPH e proteínas tais como albumina, ferritina e ceruloplasmina, que fazem parte de um sistema antioxidante capaz de converter as EROs em derivados inativos.<sup>(55-58)</sup> Esse processo de desintoxicação celular, por meio do sistema antioxidante, ocorre também no peroxissomo,<sup>(59)</sup> no qual participam as enzimas codificadas pelos genes *PRDX1*, *SOD1*, *SOD2*, *EPHX2* e *CAT*, que apresentaram expressão diferencial no presente estudo.

As enzimas da família superóxido dismutase (SOD) catalisam o superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ).<sup>(60)</sup> As peroxidases peroxirredoxina (PRDX) e glutathione peroxidase (GPX) convertem o peróxido de hidrogênio, intermediário formado pela dismutação do superóxido, em água ( $H_2O$ ) na via antioxidante. A enzima peroxirredoxina 1 (PRDX1) promove a eliminação de

peróxido de hidrogênio *in vivo* e pode regular EROs induzidas por sinalização de fatores de crescimento.<sup>(60)</sup> Estudo com camundongos *PRDX1-knockout* indicou um papel de PRDX1 na supressão tumoral por eliminação de EROs e prevenção de danos oxidativos.<sup>(61)</sup> Entretanto, evidências sugerem que células tumorais proliferativas podem expressar PRDX para proteção contra danos oxidativos. Expressão elevada de PRDX1 foi observada em mesotelioma maligno,<sup>(62)</sup> câncer de bexiga,<sup>(63)</sup> pulmão,<sup>(64)</sup> mama<sup>(65)</sup> e esôfago.<sup>(66)</sup>

A expressão do gene *PRDX1* no presente estudo apresentou-se significativamente reduzida nos tumores de CEC oral em relação ao tecido não tumoral adjacente. Esse resultado está de acordo com achados de Cao e colaboradores (2009)<sup>(67)</sup> sobre o papel da PRDX1 na promoção da função supressora tumoral de PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) por meio da proteção de sua atividade fosfatase lipídica decorrente da inativação induzida pelo peróxido de hidrogênio. Além disso, foi observado que PRDX1 controla a atividade celular de Akt (*Protein Kinase B*) e reduz a suscetibilidade a transformação maligna induzida por H-Ras (*Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene*) e ErbB-2 (*Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*).<sup>(67)</sup>

Superóxido dismutase 1 (SOD1), também conhecida como Cu/ZnSOD (*copper-zinc superoxide dismutase*), é uma metaloenzima homodimérica que contém cobre e zinco em sua conformação. Esta enzima está distribuída, principalmente no citoplasma<sup>(68)</sup> e em menor proporção nos espaços das intermembranas da mitocôndria,<sup>(69,70)</sup> no núcleo celular, lisossomos e peroxissomos.<sup>(71)</sup> A função da enzima SOD1 é evitar o acúmulo de EROs e de proteínas alteradas nas membranas da mitocôndria, evitando danos oxidativos e o câncer.<sup>(70,72)</sup> Nesse contexto, adequados

níveis de antioxidantes são necessários para evitar os danos celulares causados por EROs.

A inibição da expressão de SOD1 levou ao aumento da suscetibilidade a tumores de fígado em camundongos<sup>(73)</sup> como consequência de altas taxas de mutações no DNA que ocorrem em estágio precoce de desenvolvimento.<sup>(74)</sup> Em células tumorais, a inibição de SOD1 atua na prevenção da formação de níveis elevados de peróxido de hidrogênio, resultando na proteção de proteínas tirosina fosfatases dos efeitos da oxidação, levando a inibição da fosforilação de ERK 1 e 2 (*extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) mediada por fatores de crescimento como EGF (*epidermal growth factor*), IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) e FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*). A via de sinalização ERK é importante para a sobrevivência e proliferação de células tumorais.<sup>(75)</sup> Esses achados sugerem que SOD1 pode ser utilizada como alvo terapêutico no tratamento do câncer por resultar na inibição de múltiplas vias importantes para as funções celulares do tumor.

No presente estudo a expressão gênica de *SOD1* apresentou-se reduzida, concordando com esses achados. A baixa expressão de SOD1 também foi observada em outros tipos tumorais, como adenocarcinoma gástrico<sup>(76)</sup> e endometrial.<sup>(77)</sup> Por outro lado, níveis elevados foram observados em linhagens de adenocarcinoma de pulmão<sup>(78)</sup> e de mama,<sup>(79)</sup> sugerindo atividade diferencial de SOD1 em diferentes tipos tumorais.

A enzima SOD2 (superóxido dismutase 2) ou MnSOD (*manganese superoxide dismutase*) localiza-se na matriz mitocondrial onde converte o superóxido gerado pela cadeia respiratória em peróxido de hidrogênio. SOD2 desempenha papel importante contra o estresse oxidativo. Existe variação no nível de expressão gênica de *SOD2* em diferentes tipos de tumor e este pode estar relacionado ao estadiamento e ou a

progressão da doença.<sup>(80)</sup> Assim como no presente estudo, a expressão de *SOD2* é frequentemente elevada em tumores, uma vez que há grande produção de EROs dentro da mitocôndria onde atua como um mecanismo protetor dessas células na manutenção de sua sobrevivência e crescimento.<sup>(81)</sup> Elevados níveis de *SOD2* foram observados em vários tipos de tumores como carcinoma de cólon, esôfago, estômago,<sup>(82)</sup> tireoide,<sup>(83)</sup> cérebro,<sup>(84)</sup> cabeça e pescoço<sup>(85)</sup> e ovário.<sup>(86)</sup>

Linhagens de células de câncer de mama metastático não dependente de estrogênio apresentaram elevada expressão gênica e proteica de *SOD2* e baixa expressão de enzimas antioxidantes catalisadoras de peróxido de hidrogênio na mitocôndria, sugerindo que a atividade elevada de algumas enzimas antioxidantes podem ser essenciais para o desenvolvimento tumoral. Estes resultados mostram que *SOD2* é um importante modulador do fenótipo invasivo nestas células, resultando em um pior prognóstico em tumores metastáticos de câncer de mama.<sup>(87)</sup>

Em carcinoma oral de células escamosas a expressão de *SOD2* também contribuiu para o desenvolvimento e progressão do câncer.<sup>(88)</sup> Células bem diferenciadas de carcinoma de células escamosas de cavidade oral apresentaram expressão proteica de *SOD2* significativamente maior em relação a células da mucosa normal e foi associada com potencial invasivo nesse tipo de tumor.<sup>(88,89)</sup>

Nesse contexto, além de estarem envolvidas na sinalização metastática, proliferativa, anti-apoptótica e anti-angiogênica, EROs podem também exercer funções citotóxicas e pro-apoptóticas limitantes da progressão tumoral.<sup>(90,91)</sup> Isso explica o fato de alguns genes que codificam enzimas antioxidantes apresentarem expressão elevada em alguns tipos de tumores, como o gene *SOD2*.

A enzima SOD3 (superóxido dismutase 3), também conhecida como EC-SOD (*extracellular superoxide dismutase*), está localizada no lúmen do complexo de Golgi e na matriz extracelular<sup>(92)</sup> e também catalisa a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio, participando do processo de detoxificação de EROs. No presente estudo, o gene *SOD3* apresentou expressão reduzida nos tumores de cavidade oral, assim como em estudo de Yokoe e colaboradores (2010).<sup>(93)</sup> A expressão gênica e proteica reduzida de SOD3 também foi observada em carcinoma de tireoide,<sup>(94)</sup> câncer de pulmão,<sup>(95)</sup> adenocarcinoma ductal pancreático<sup>(96)</sup> e câncer de mama,<sup>(97)</sup> sugerindo que a redução da proteína SOD3 pode aumentar o risco para o desenvolvimento do câncer.

Na maquinaria antioxidante, a atividade de SOD3 é dependente de cobre, o qual é carregado pela enzima ATOX1 (*antioxidant 1 copper chaperone*) citoplasmática. O cobre é transferido para SOD3 pela *ATPase* de Menke (MNK) ou *ATP7A* na rede *trans* no lúmen do Complexo de Golgi.<sup>(9-100)</sup> Expressão elevada de ATOX1 foi detectada em células de câncer de pulmão por imunohistoquímica e a redução da expressão por *knockdown* foi associada com diminuição da proliferação celular estimulada por cobre<sup>(102)</sup> e redução do crescimento tumoral em modelo animal.<sup>(103)</sup> Em linhagens celulares provenientes de câncer de mama,<sup>(103)</sup> a alta expressão do gene *ATOX1* também foi observada, embora em melanoma a expressão desse e de outros genes antioxidantes apresentaram-se reduzidos.<sup>(104)</sup> Esses achados sugerem que ATOX1 desempenha um importante papel na proliferação celular e desenvolvimento do câncer e a expressão gênica elevada de *ATOX1*, observada no presente estudo, corrobora com essa hipótese. Não foram encontrados dados na literatura sobre a expressão de ATOX em tumores de cabeça e pescoço até o momento.

O gene *OXR1* (*Oxidation Resistance 1*) também possui papel importante na proteção contra o estresse oxidativo e foi identificado por sua habilidade em suprimir a mutagênese em *Escherichia coli*.<sup>(105)</sup> Em células HeLa (linhagem celular de câncer de colo de útero) deficientes em *OXR1* expostas ao peróxido de hidrogênio há elevação do estresse oxidativo,<sup>(106)</sup> o que pode contribuir para o aumento de danos celulares e transformação maligna. Assim como no presente estudo, a expressão gênica de *OXR1* foi regulada negativamente em células tumorais de mama.<sup>(107)</sup>

A enzima catalase (CAT) também participa do mecanismo antioxidante, convertendo o peróxido de hidrogênio, resultantes da dismutação do superóxido, em água. Expressão reduzida de CAT foi observada em câncer de tireoide<sup>(108)</sup> e carcinoma espinocelular oral.<sup>(109)</sup> O gene *CAT* também apresentou expressão reduzida no presente estudo, reforçando a importância do papel das enzimas antioxidantes na neutralização dos efeitos nocivos de EROs.<sup>(110)</sup>

A expressão elevada de CAT reverte características malignas em diferentes linhagens celulares<sup>(111)</sup> e previne o crescimento tumoral e metástase em estudos *in vivo*.<sup>(112)</sup> Além disso, em células de adenocarcinoma de pulmão, o tratamento com CAT causou efeito citostático, inibindo o crescimento e a proliferação celular e exibiu efeito sinérgico com várias drogas anticâncer como cisplatina, 5-fluorouracil e hidroxiureia, apontando um efeito benéfico da terapia adjuvante com CAT no tratamento do adenocarcinoma de pulmão.<sup>(113)</sup>

Os genes *CAT* e *SOD2* também codificam proteínas que participam da via de sinalização FoxO (*Forkhead box O*), relacionada a regulação da expressão de genes em processos fisiológicos como apoptose, ciclo celular,<sup>(114)</sup> metabolismo da glicose<sup>(115)</sup> e estresse oxidativo.<sup>(116,117)</sup> Em resposta à insulina ou a fatores de crescimento, os fatores

de transcrição FoxO são fosforilados pela *protein kinase B*, também conhecida por Akt (PKB/Akt), que regula os processos de proliferação e sobrevivência celular.<sup>(118)</sup>

Alvos dos fatores de transcrição FoxO incluem genes que codificam proteínas antioxidantes intra e extracelulares, as quais catalisam a redução dos níveis de oxigênio, envolvidos na formação de EROs, e de danos oxidativos nas biomoléculas celulares. Em humanos, as proteínas antioxidantes reguladas por FoxO incluem a SOD2.<sup>(120,121)</sup> Após ser regulada por FoxO3, a enzima CAT participa da dismutação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio.<sup>(122)</sup> Portanto, a expressão dos genes que codificam essas proteínas antioxidantes é um fator determinante para a desintoxicação celular e redução de danos provocados pelo estresse oxidativo.

Envolvida também na produção de EROs, a via da carcinogênese química inclui o metabolismo e a biodegradação de xenobióticos e pode resultar na promoção de vários tipos de câncer nos seres humanos.<sup>(123)</sup> Carcinógenos químicos atuam por meio de mecanismos genotóxicos, causadores de adutos em macromoléculas biológicas como DNA e RNA, ou mecanismos não genotóxicos, como indução de inflamação, imunossupressão, ativação de receptores e silenciamento epigenético.<sup>(124,125)</sup> A combinação dos dois tipos de mecanismos altera as vias transdutoras de sinal, ocasionando instabilidade genômica e outros eventos característicos do fenótipo cancerígeno, como resistência a apoptose e descontrole da proliferação celular.<sup>(126,127)</sup> Participa da via de carcinogênese química o gene diferencialmente expresso *MGST3* (*Microsomal glutathione S-transferase 3*), que codifica uma proteína associada à membrana responsável por reduzir a glutathiona (GSH), participando da eliminação de compostos químicos prejudiciais.<sup>(128)</sup>

Além da via de metabolização de carcinógenos químicos, a proteína *MGST3* também participa do metabolismo de drogas e de xenobióticos pelas Citocromo P450 e metabolismo da GSH, exercendo ação antioxidante sobre compostos endógenos e exógenos. A expressão reduzida de *MGST3* como observada no presente estudo pode contribuir para a detoxificação ineficiente de carcinógenos e desenvolvimento celular maligno.<sup>(129)</sup>

Além de *MGST3*, também participam da via do metabolismo da GSH os genes, *GSTZ1* (*Glutathione S-transferase zeta 1*), *PRDX4* (*Peroxiredoxin 4*), *GSR* (*Glutathione reductase*) e *GPX3* (*Glutathione peroxidase 3*).<sup>(130)</sup> A GSH é um composto tiol não protéico e consiste em um tripeptídeo sintetizado a partir dos aminoácidos precursores gama-glutamato, glicina e cisteína.<sup>(131)</sup>

Além da sua importância nas reações de conjugação, a GSH participa da biotransformação antioxidativa de compostos endógenos e exógenos. A GSH ataca o substrato eletrofílico formando uma ligação tio-éter no espaço entre seu resíduo de cisteína, resultando em um conjugado menos reativo e com maior solubilidade em água, facilitando sua excreção.<sup>(132)</sup>

Os genes regulados negativamente *GSTZ1* e *MGST3* codificam enzimas glutatônicas S-transferases (GSTs) que catalisam o ataque nucleofílico da GSH reduzida a compostos não polares que contenham um átomo de enxofre, nitrogênio ou carbono eletrofílico. Os conjugados formados são excretados na vesícula biliar e convertidos em cisteína, enquanto que os ácidos mercaptúricos gerados na catálise com *MGST3* são eliminados por meio dos intestinos e rins.<sup>(133)</sup>

O gene *GSR* (*Glutathione-disulfide reductase*) codifica a enzima glutatônica redutase, uma flavoproteína homodimérica que reduz a dissulfureto de GSH oxidada



(GSSG) para a forma sulfidril de GSH.<sup>(134)</sup> O gene *GPX3* também participa da reação de conversão de GSSG em GSH reduzida.<sup>(135)</sup> Os genes *GSTZ1*, *MGST3*, *GSR* e *GPX3* apresentaram expressão reduzida no presente estudo, reforçando o seu papel na maquinaria antioxidante catalisada por GSH.

O gene *PRDX4* codifica a enzima peroxirredoxina 4, cujo papel é reduzir peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos em água e álcool. A enzima possui dupla função, atuando como captador de peróxido de hidrogênio em células normais e como um fator de sobrevivência em células tumorais,<sup>(136)</sup> assim como ATOX1. A expressão elevada da proteína PRDX4 foi associada com presença de tumores primários de cavidade oral e comprometimento de linfonodos em estudo anterior. Além disso, foi considerado importante fator prognóstico para esse tipo tumoral.<sup>(137)</sup> A atividade de PRDX4 tem função importante na regulação da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*Factor nuclear kappa B*), o qual foi associado com hipermetilação do supressor tumoral PTEN em carcinoma de nasofaringe<sup>(138)</sup> e com processos de invasão e migração de diversos tipos de câncer.<sup>(139,140)</sup> A alta expressão gênica de *PRDX4* observada no presente estudo corrobora com a atuação da proteína na promoção do desenvolvimento tumoral.

A síntese do hormônio tireoidiano é outra via relacionada à promoção do desenvolvimento de tumores, como câncer de cólon, mama, próstata e pulmão.<sup>(141)</sup> Participam dessa via os genes diferencialmente expressos *GSR*, *GPX3*, *Dual oxidase 1 (DUOX1)* e *Dual oxidase 2 (DUOX2)*. Os genes *DUOX1* e *DUOX2*, com expressão reduzida nos tumores orais no presente estudo, também participam da síntese do hormônio tireoidiano por meio da geração de peróxido de hidrogênio.<sup>(142-144)</sup> A síntese dos hormônios da tireoide ocorre inicialmente pela oxidação do iodeto pela

Tireoperoxidase (TPO), utilizando o peróxido de hidrogênio para formar iodotirosinas, iodotironinas, tiroxina (T4) e triiodotoronina (T3).<sup>(145)</sup>

Entre as NADPH oxidases, DUOX1 e DUOX2 são as únicas que catalisam a produção de peróxido de hidrogênio extracelular ao invés de superóxido, que é o primeiro produto da redução do oxigênio.<sup>(146)</sup> A expressão reduzida dos genes *DUOX1* e *DUOX2* observada no presente estudo sugere deficiência do sistema de antioxidação pela redução do superóxido, elevando as concentrações dessa ERO e conseqüentemente, aumentando o estresse oxidativo no microambiente tumoral.

Corroborando com os resultados do presente estudo, evidências indicam que *DUOX1* pode atuar como supressor tumoral seletivo durante a iniciação e progressão do câncer.<sup>(147)</sup> Em tumores de pulmão, *DUOX1* é frequentemente silenciado por hipermetilação da região promotora.<sup>(148)</sup> Estudo recente encontrou sua expressão reduzida também em linhagem de câncer de fígado e carcinoma hepatocelular primário.<sup>(148)</sup> Além disso, alta expressão enzimática de DUOX1 em carcinoma de tireoide está associada ao risco reduzido de morte.<sup>(149)</sup> Nesse contexto, a expressão reduzida de *DUOX1* em carcinoma oral de células escamosas corrobora com seu papel como supressor do crescimento tumoral relacionado à indução da parada da fase G2/M do ciclo celular e ao aumento da geração de EROs.<sup>(147)</sup>

Em relação ao gene *DUOX2*, embora sua expressão elevada tenha sido associada com outros tipos de câncer, como estômago e colo de útero,<sup>(149)</sup> a expressão reduzida desse gene em carcinoma oral, como observada no presente estudo, pode estar relacionada com aumento da produção de EROs e promoção do crescimento tumoral, assim como DUOX1.

O peróxido de hidrogênio gerado pelas DUOX é metabolizado intracelularmente pela enzima GPX3 no processo de redução e oxidação da GSH. *GPX3* é regulado negativamente em vários tipos de câncer; no entanto o mecanismo de ação da proteína nas células tumorais não está totalmente esclarecido. Por ser uma proteína de membrana, sugere-se que GPX3 atua como um bloqueador redox para discriminar entre estímulos inflamatórios relevantes e irrelevantes.<sup>(150,151)</sup>

A enzima GSR também atua nessa via reduzindo *selenodiglutathione* (GSSeSG) em *gluthathioselenol* (GSSeH) e GSH reduzida, participando, assim, do sistema de antioxidação.<sup>(152-153)</sup> A expressão reduzida dessas enzimas sugere uma deficiência no mecanismo de oxirredução em câncer oral e pode contribuir para o desenvolvimento tumoral.

O metabolismo do ácido araquidônico também apresenta importância no processo de tumorigênese. Participando dessa via metabólica, os genes *GPX3*, *ALOX12* (*Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S type*) e *EPHX2* (*Epoxide Hidrolase 2*) apresentaram expressão reduzida no presente estudo. Este metabolismo é responsável pela produção dos ácidos graxos eicosanóides que são importantes na sinalização de moduladores de processos fisiológicos, tais como dor, febre, liberação do ácido gástrico, contração e relaxamento do músculo liso. Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico também estão associados com processos inflamatórios importantes na carcinogênese.<sup>(154,155)</sup>

A enzima *ALOX12* metaboliza o ácido araquidônico em 12(S)-HETE (*5Z,8Z,10E,14Z*)-(12S)-12-Hydroxyicoso-5,8,10,14-tetraenoic acid),<sup>(156)</sup> o qual é associado com progressão tumoral e metástase, além de outras condições patológicas.<sup>(157-160)</sup> 12(S)-HETE atua na modulação de integrinas, regula a secreção de

proteínases, aumenta a motilidade e invasão de células tumorais e induz a angiogênese.<sup>(157,161,162)</sup> A expressão gênica elevada de *ALOX12* foi detectada em vários tipos tumorais como câncer de mama, renal, pancreático e de próstata.<sup>(163,164)</sup> Interessantemente, em CEC de cavidade oral a expressão de *ALOX12* apresentou-se reduzida, de acordo com os resultados do presente estudo, assim como no estudo de Russo (2015). Esse achado sugere que a ação de *ALOX12* pode não ser essencial para a tumorigênese na cavidade oral, que possivelmente recruta outros mecanismos para o desenvolvimento desse tipo tumoral.

Os genes *GPX3* e *EPHX2* também apresentaram expressão reduzida nas amostras de CEC oral. Assim como outras GPXs, a enzima *GPX3* pode prevenir a ativação de lipoxigenases, como *ALOX12*, evitando a amplificação da sinalização na membrana celular e, conseqüentemente, excessiva resposta inflamatória,<sup>(165)</sup> o que corrobora com os achados deste estudo, bem como o de Russo (2015) ambos relacionados à expressão reduzida dessa enzima. Embora os tumores orais tenham apresentado expressão reduzida de *ALOX12*, outras enzimas reguladas por *GPX3* podem atuar no câncer oral.

O gene *EPHX2*, que codifica a enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH), apresentou redução da expressão nos tumores orais no presente estudo, assim como em neoplasma maligno de fígado<sup>(165)</sup> e rim.<sup>(166)</sup> Entretanto, aumento da expressão foi observado em outros tipos tumorais, como câncer ovariano avançado.<sup>(167)</sup> No metabolismo do ácido araquidônico, a proteína *EPHX2* degrada ácidos graxos epóxi bioreativos derivados do ácido araquidônico pelo metabolismo da Citocromo P450 (CYP).<sup>(168)</sup> Em linhagem de carcinoma de cabeça e pescoço, *EPHX2* apresentou aumento da expressão em resposta à administração de N'-nitrosornicotina, um

produto da metabolização do tabaco.<sup>(169)</sup> No entanto, não há dados suficientes na literatura que esclareçam o papel de EPHX2 no processo de tumorigênese.

O metabolismo de aminoácidos também apresenta importância na carcinogênese, uma vez que são precursores para a síntese de proteínas e, também, participam de várias reações como metabólitos intermediários. Os aminoácidos são necessários para sinalização de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), funcionalmente ativada no câncer, que regula processos celulares como crescimento, proliferação, motilidade, sobrevivência, síntese proteica, autofagia e transcrição.<sup>(170)</sup> Na ausência de aminoácidos, a ligação de mTOR aos seus substratos é comprometida. A eficiente interação entre Raptor (*Regulatory-associated protein of mTOR*) e substratos de mTOR depende de uma alteração conformacional promovida por aminoácidos, que aumentam a acessibilidade do substrato à mTOR e às suas quinases associadas.<sup>(171)</sup> As enzimas CAT e GSTZ1 participam do metabolismo de aminoácidos e a expressão reduzida dos genes que codificam essas enzimas pode estar associada a alterações em vias importantes de sinalização celular relacionadas ao câncer.

O gene *DHCR24* (*24-dehydrocholesterol reductase*), o qual também apresentou expressão reduzida no presente estudo, participa da biossíntese de esteroides, por meio das vias latosterol e desmosterol. A enzima DHCR24 catalisa a reação de redução do zimosterol até a formação de colesterol.<sup>(172)</sup> O colesterol é matéria prima essencial para a célula, porém apresenta toxicidade em quantidades excessivas e pode contribuir para o desenvolvimento de doenças. Assim, os níveis celulares de colesterol são regulados por um mecanismo equilibrado de síntese, utilização e efluxo.<sup>(172)</sup>

Em contraste com os achados do presente estudo, expressão gênica elevada de *DHCR24* foi observada em tumores de mama<sup>(173)</sup> e próstata.<sup>(174)</sup> Além disso, elevados

níveis de DHCR24 foram associados à progressão tumoral em câncer de próstata<sup>(175)</sup> e melanoma<sup>(176)</sup> o que poderia estar associado ao aumento da síntese de colesterol. Assim, o gene *DHCR24* parece não influenciar na carcinogênese oral por meio da via do colesterol, mas por outros mecanismos nos quais participa, como controle do estresse oxidativo,<sup>(177)</sup> apoptose celular<sup>(178)</sup> e processo inflamatório.<sup>(179-181)</sup> Uma vez que exerce atividade antioxidante e antiinflamatória, quantidades reduzidas dessa enzima em consequência da expressão gênica reduzida, poderia levar a deficiência na eliminação das EROs e aumento do processo inflamatório, propiciando o desenvolvimento tumoral.

O gene que apresentou maior expressão em CEC oral no presente estudo foi o *PRPN* (*Prion protein*), que codifica a Proteína Prion Celular (PrP<sup>c</sup>), uma sialoglicoproteína de membrana ancorada à membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI).<sup>(182,183)</sup> PrP<sup>c</sup> é expressa em vários tecidos, principalmente no cérebro, e é associada com doenças neurodegenerativas. Entretanto, evidências sugerem um papel importante dessa proteína na biologia do câncer.<sup>(183,184)</sup>

Estudos demonstraram a participação da proteína PrP<sup>c</sup> em importantes processos como neuroproteção, migração e adesão, inflamação e proliferação celular.<sup>(185)</sup> PrP<sup>c</sup> é altamente expressa em vários tipos de câncer incluindo glioma,<sup>(186)</sup> câncer de mama,<sup>(187,188)</sup> tumor de próstata,<sup>(189)</sup> câncer gástrico,<sup>(190)</sup> câncer colorretal,<sup>(191)</sup> câncer pancreático,<sup>(192)</sup> osteosarcoma,<sup>(193)</sup> e CEC de cavidade oral.<sup>(194)</sup>

Os mecanismos pelos quais a expressão elevada de PrP<sup>c</sup> pode induzir o desenvolvimento tumoral incluem sinalizações de fatores conhecidamente envolvidos no processo da carcinogênese. A expressão elevada de PrP<sup>c</sup> foi associada com pior prognóstico no câncer de mama<sup>(195)</sup> e promoveu o aumento da migração e invasão

celular por meio do aumento da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9) e ativação da via de NF- $\kappa$ B e ERK.<sup>(196)</sup>

Em linhagens de câncer oral e de cólon, foi observada associação entre a elevada expressão de PrP<sup>c</sup> e a redução da apoptose induzida pelo estresse oxidativo<sup>(197)</sup> e aumento da motilidade e invasão celular.<sup>(198)</sup> Além disso, altos níveis de expressão também foram observados em células de carcinoma espinocelular de células escamosas de cavidade oral, e foram associados com progressão e estadiamento avançado por alteração na sinalização de p53.<sup>(194)</sup>

Também envolvido no mecanismo apoptótico, o gene *GRLX2* (*Glutaredoxin 2*), cuja expressão foi reduzida no presente estudo, codifica uma proteína denominada Glutarredoxina 2, pertencente a família das glutarredoxinas (Grx) responsável pela manutenção da homeostase celular.<sup>(199)</sup>

As Grxs são enzimas responsáveis pela deglutationilação de proteínas, ou seja, a remoção de GSH.<sup>(200)</sup> Desempenham importantes funções nos processos celulares, tais como assimilação de enxofre, biossíntese do DNA, apoptose, regulação redox via eliminação de EROs, intermediação da atividade do fator de ligação transcricional, diferenciação celular e defesa contra o estresse oxidativo.<sup>(201)</sup>

Grx é conhecida por regular a atividade de várias proteínas por deglutationilação, tais como Ras, Fz, ASK1, NF- $\kappa$ B e pró-caspase-3, as quais desempenham importante papel no controle da apoptose celular.<sup>(202)</sup> Alterações na glutathionilação de proteínas podem resultar em sobrevida ou apoptose celular, dependendo do tipo celular e dano tecidual. A deglutathionilação de Ras pode resultar na ativação da via MEKK (*Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal*

*regulated kinase kinase kinase*) e inibição de Akt, resultando na ativação de proteínas efetoras da apoptose.<sup>(202)</sup>

Em células endoteliais tratadas com fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) foi observado um aumento da atividade de Grx e concomitante aumento da clivagem de pró-caspase-3 resultando em morte celular.<sup>(202)</sup> Esse resultado sugere um papel de Grx na propagação de sinais apoptóticos. Nesse contexto, a redução da expressão de *GRLX2* poderia evitar a morte das células tumorais de cavidade oral, contribuindo para o desenvolvimento do tumor.

Apesar de Grx promover a apoptose por meio da pró-caspase-3, também catalisa a deglutinação de Fas (*Fas Cell Surface Death Receptor*), o que poderia inibir o processo de morte celular.<sup>(203)</sup> Com base nessas evidências, os mecanismos de regulação da apoptose apresentam diferenças que podem estar relacionadas ao tipo celular ou estímulo, e, ainda, à via de sinalização predominantemente ativada nas células tumorais.

O gene *CSDE1* (*Cold shock domain containing E1*), que codifica a proteína com domínio *cold shock* conhecida como Unr (*up stream of N-ras*), apresentou expressão reduzida nos tumores orais no presente estudo. Proteínas com domínio *cold shock* pertencem à família de proteínas de ligação com ácidos nucléicos e atuam na regulação da transcrição de genes, tradução proteica e proliferação celular. A expressão de proteínas com domínio *cold shock* é induzida pelo estresse celular. Essas proteínas são constantemente secretadas e ligam-se a receptores específicos na superfície celular, influenciando a capacidade proliferativa e migratória da célula.<sup>(204)</sup>

A expressão da proteína Unr pode ser regulada de várias maneiras, incluindo auto-regulação e inibição por genes específicos, como *c-myc*,<sup>(205)</sup> um oncogene relacionado à rápida proliferação de células tumorais. Apesar de *c-myc* apresentar



expressão elevada em CEC oral de acordo com resultados da literatura, não existem dados consistentes na literatura sobre o papel da proteína Unr nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.<sup>(206)</sup>

O gene *OXSRI* (*Oxidative-stress responsive1*), também conhecido com *OSR1*, apresentou expressão reduzida no presente estudo. O gene *OXSRI* codifica a proteína OSR1 que pertence à família de proteínas quinase Ser/Thr responsáveis pela regulação do transporte de íon e regulação de sinalizações *downstream* em resposta ao estresse ambiental.<sup>(207)</sup> A proteína OSR1 é ativada em resposta ao estresse oxidativo<sup>(208)</sup> e está envolvida na indução da angiogênese em células HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) por meio da ativação da proteína *With no lysine (K)* (WNK) 1.<sup>(209)</sup>

Não foram encontrados dados na literatura sobre a expressão gênica e proteica de OSR1 em células tumorais. Entretanto, o gene *OXSRI* apresentou hipermetilação da região promotora em carcinoma espinocelular de pulmão.<sup>(210)</sup> A inibição da transcrição gênica por metilação de região promotora é um mecanismo bem estabelecido.<sup>(211)</sup> É possível que *OXSRI* apresente hipermetilação em CEC oral, o que levaria à redução da expressão gênica, assim como observado no presente estudo. Entretanto, não há dados na literatura sobre a expressão desse gene nesse tipo tumoral.

Estudo em células renais embrionárias mostrou que OSR1 é responsável pela fosforilação do receptor do fator de necrose tumoral RELT (*Receptor expressed in lymphoid tissues*).<sup>(212)</sup> Os fatores de necrose tumoral (TNF) são proteínas envolvidas na morte de células tumorais<sup>(213)</sup> e participam de importantes processos celulares como proliferação celular, apoptose, inflamação e resposta ao estresse.<sup>(214)</sup> Nesse contexto, a ativação de RELT por OSR1 parece ser um importante mecanismo para a indução da apoptose e a inibição do desenvolvimento tumoral. Assim, a expressão reduzida de

*OXSRI* em CEC oral, no presente estudo, corrobora com seu papel na proteção celular e inibição da transformação maligna.

Nossos resultados mostraram que genes que participam do processo de detoxificação celular apresentam expressão diferencial em tumores de cavidade oral. As enzimas codificadas por esses genes possuem papel importante em mecanismos fisiológicos importantes no processo de tumorigênese.

***CONCLUSÃO***

---

## **5. CONCLUSÃO**

1. Genes codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo de compostos exógenos apresentam expressão diferencial em carcinoma espinocelular de cavidade oral.

2. A expressão de genes envolvidos no metabolismo antioxidativo não diferencia pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos.

3. A expressão alterada desses genes pode levar a desregulação de processos biológicos importantes para a carcinogênese, como inflamação, angiogênese, apoptose, instabilidade genômica, invasão, sobrevivência e proliferação celular, e contribuir para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cavidade oral.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2008;83:489-501.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em:<http://globocan.iarc.fr>, acesso em 20 de agosto de 2016.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2015, 122p.
4. Agulnik M. Malignancies of the head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11(2): 207-17.
5. 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.
6. Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Rozek LS, Soliman AS. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. In: (Ed.). *Oral Oncol.* 2010; 46(8): 591-6.
7. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11(1): c9-22.
8. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.
9. Muscat JE, Chen G, Knipe A, Stellman SD, Lazarus P, Richie JP Jr. Effects of

- menthol on tobacco smoke exposure, nicotine dependence, and NNAL glucuronidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(1): 35-41.
10. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1951-7.
  11. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts DB, Wei Q, Sturgis EM. Matched-pair analysis of survival of never smokers and ever smokers with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004;22(19):3981-8.
  12. Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Roy A, Sharma P. Reconvence and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25(3):225-43.
  13. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7:149-56.
  14. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2008;99(10):777-89.
  15. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H, et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(3):157-65.
  16. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):1974-81.
  17. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, et al. Alcohol

- consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60(12):3155-9.
18. Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer.* 2009;9:187.
  19. Nelson, D. R. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 2006;320:1-10.
  20. Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):70-83.
  21. Pavarino EC, Russo A, Galbiatti ALS, Almeida WP, Goloni-Bertollo EM. Glutathione: Biosynthesis and Mechanism of Action. In: Nikolaos Labrou; Emmanouil Flemetakis. (Org.). *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*. 1ªed.: Nova Science Publishers, Inc., 2013:01-34.
  22. Russo, Anelise. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna; Medicina e Ciências Correlatas) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2011.
  23. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, Raposo LS, ManÃglia JV, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep.* 2013 Jul;40(7):4181-8.
  24. Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer



- development. *Front Biosci.* 2004;9:1967-76.
25. Rooseboom, M.; Commandeur, J. N.; Vermeulen, N. P. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev.* 2004;56:53-102.
  26. 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.
  27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219:1-14.
  28. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazure M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biol Inter* 2006;160:1–40.
  29. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012;24(5):981-90.
  30. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5.
  31. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett.* 2000;151(1):87-95.
  32. Anderson, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 1998;111-112:1-14.
  33. 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 Mar;390(3):191-214.

34. Stitch HF, Anders F. The involvement of reactive oxygen species in oral câncer of betel quid-tobacco chewers. *Mutat Res* 1989;214:47–61.
35. Hasnis E, Reznick AZ, Pollack S, Klein Y, Nagler RM. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lymphocytes – the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and the possible implications for oral cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:826–39.
36. Bagchi M, Bagchi D, Patterson EB, Tang L, Stohs SG. Age related changes in lipid peroxidation and antioxidant defense in Fischer 344 rat. *Ann NY Acad Sci* 1996;793:449–52.
37. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995;358:1–3.
38. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:341–346.
39. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35: 1147-50.
40. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44:275-95.
41. Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Front Pharmacol.* 2014;5:170.
42. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(9):1373–80.
43. Masood, N.; Malik, F. A.; Kayani, M. A. Expression of xenobiotic metabolizing

- genes in head and neck cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(2): 377-82.
44. 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.
45. 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.
46. Sobin L, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition: UICC; 2009.*
47. 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;1333-1334.
48. 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.
49. 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.
50. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154(2):95-105.
51. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med.* 2009;30:60-76.
52. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE,

- Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 2005;11:1306-13.
53. D'Autréaux B and Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:813-24.
54. Bhattacharyya S and Saha J. Tumour, oxidative stress and host t cell response: Cementing the dominance. *Scand J Immunol* 2015;82: 477-88.
55. Barreiros ALBS, David JM, David JP – Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 2006;29:113-120.
56. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-312.
57. Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother.* 2005;59(7):374-9.
58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
59. Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP, Fransen M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol.* 2015 May 27;3:35.
60. Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J BiolChem* 2004; 279:50994- 1001.
61. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al.

- Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003;424: 561-565.
62. Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho WR, Kang SW, Rhee SG et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002;196: 316-323.
63. Quan C, Cha EJ, Lee HL, Han KH, Lee KM, Kim WJ. Enhanced expression of peroxiredoxin I and 6 correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer. *J Urol* 2006;175: 1512-1516.
64. Lehtonen ST, Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hirvikoski P, Kang SW, et al. Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer. *Int J Cancer* 2004;111: 514-521.
65. Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21: 2085-2090.
66. Gong F, Hou G, Liu H, Zhang M. Peroxiredoxin 1 promotes tumorigenesis through regulating the activity of mTOR/p70S6K pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2015;32:25.
67. Cao J, Schulte J, Knight A, Leslie NR, Zagodzón A, Bronson R, et al. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO J*. 2009;28(10):1505-17.
68. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, and Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89: 10405–10409.
69. Okado-Matsumoto A and Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-,SOD in mitochondria. *J Biol Chem*

- 2001;276: 38388–38393.
70. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, and Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 2001;276: 38084–38089.
71. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol.* 1988;107(6 Pt 1):2169-79.
72. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005;24(3):367-80.
73. Busuttill RA, Garcia AM, Cabrera C, Rodriguez A, Suh Y, Kim WH, et al. Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice. *Cancer Res.* 2005;65(24):11271-5.
74. Juarez JC, Manuia M, Burnett ME, Betancourt O, Boivin B, Shaw DE, et al. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(20):7147-52.
75. Mehdizadeh A, Somi MH, Darabi M, Jabbarpour-Bonyadi M. Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2016;43(2):107-16.
76. Monari M, Trincherro A, Calabrese C, Cattani O, Serrazanetti GP, Foschi J, et al. Superoxide dismutase in gastric adenocarcinoma: is it a clinical biomarker in the

- development of cancer? *Biomarkers*. 2006;11(6):574-84.
77. Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Cvetković D, Lucić N, Radojčić RM, et al. Superoxide dismutase and lipid hydroperoxides in blood and endometrial tissue of patients with benign, hyperplastic and malignant endometrium. *An Acad Bras Cienc*. 2008 Sep;80(3):515-22.
78. Lee SY, Jeon HM, Kim CH, Jeong EK, Ju MK, Park SY, et al. CuZnSOD and MnSOD inhibit metabolic stress-induced necrosis and multicellular tumour spheroid growth. *Int J Oncol*. 2010;37(1):195-202.
79. Papa L, Manfredi G, Germain D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer*. 2014;5(1-2):15-21.
80. Dhar SK, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(11-12):2209-22.
81. Hart PC, Mao M, de Abreu AL, Ansenberger-Fricano K, Ekoue DN, Ganini D, et al. MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nat Commun*. 2015;6:6053.
82. Izutani R, Asano S, Imano M, Kuroda D, Kato M, Ohyanagi H. Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. *J Gastroenterol*. 1998;33(6):816-22.
83. Nishida S, Akai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kusunoki T, Suzuki K, et al. Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours. *J Pathol*. 1993 Mar;169(3):341-5.
84. Landriscina M, Remiddi F, Ria F, Palazzotti B, De Leo ME, Iacoangeli M, et al. The level of MnSOD is directly correlated with grade of brain tumours of neuroepithelial origin. *Br J Cancer*. 1996;74(12):1877-85.

85. Lo WY, Tsai MH, Tsai Y, Hua CH, Tsai FJ, Huang SY, et al. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin Chim Acta*. 2007;376(1-2):101-7.
86. Hemachandra LP, Shin DH, Dier U, Iuliano JN, Engelberth SA, Uusitalo LM, et al. Mitochondrial Superoxide Dismutase Has a Protumorigenic Role in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2015;75(22):4973-84.
87. Kattan Z, Minig V, Leroy P, Dauça M, Becuwe P. Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108(2):203-15.
88. Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T. Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese superoxide dismutase up-regulate hypoxia inducible factor 1 alpha expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Free Radic Biol Med* 2010;48: 1321-1329.
89. Yang J, Lam EW, Hammad HM, Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 2002;31: 71-77.
90. Cabello CM, Bair WB 3rd, Wondrak GT. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007 ;8(12):1022-37.
91. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res*. 2007;13(3):789-94.
92. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62.
93. Yokoe H, Nomura H, Yamano Y, Fushimi K, Sakamoto Y, Ogawara K, et al.



- Alteration of extracellular superoxide dismutase expression is associated with an aggressive phenotype of oral squamous-cell carcinoma. *Exp Ther Med*. 2010;1(4):585-590.
94. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, Hoste C, Cantisani MC, Laurila JP, et al. Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker down-regulated in cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(3):785-96.
95. Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin pathol*. 2004;122(3):395–404.
96. O'Leary BR, Fath MA, Bellizzi AM, Hrabe JE, Button AM, Allen BG, et al. Loss of SOD3 (EcSOD) Expression Promotes an Aggressive Phenotype in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1741-51.
97. Teoh-Fitzgerald ML, Fitzgerald MP, Zhong W, Askeland RW, Domann FE. Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation, tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2014;33(3):358-68.
98. National Center for Biotechnology Information - RefSeq. Homo sapiens antioxidant 1 copper chaperone (ATOX1), mRNA. 2008; [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_004045.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004045.3).
99. Lutsenko S, Gupta A, Burkhead JL, Zuzel V. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys*. 2008;476(1):22-32.
100. La Fontaine S, Mercer JF. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and

- ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 2007;463(2):149-67.
101. Cai H, Peng F. Knockdown of copper chaperone antioxidant-1 by RNA interference inhibits copper-stimulated proliferation of non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2013;30(1):269-75.
102. Wang J, Luo C, Shan C, You Q, Lu J, Elf S, et al. Inhibition of human copper trafficking by a small molecule significantly attenuates cancer cell proliferation. *Nat Chem*. 2015;7(12):968-79.
103. Choong LY, Lim S, Chong PK, Wong CY, Shah N, Lim YP. Proteome-wide profiling of the MCF10AT breast cancer progression model. *PLoS One*. 2010;5(6):e11030.
104. Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1292-304.
105. Elliott NA, Volkert MR. Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Mol Cell Biol*. 2004;24(8):3180-7.
106. Yang M, Luna L, Sørnbø JG, Alseth I, Johansen RF, Backe PH, et al. Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide -induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radic Biol Med*. 2014;77:41-8.
107. Sirchia R, Luparello C. Mid-region parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and gene expression of MDA-MB231 breast cancer cells. *Biol Chem*. 2007;388(5):457-65.

- 
108. Wang CD, Sun Y, Chen N, Huang L, Huang JW, Zhu M, et al. The Role of Catalase C262T Gene Polymorphism in the Susceptibility and Survival of Cancers. *Sci Rep.* 2016;6:26973.
  109. Srivastava KC, Austin RD, Shrivastava D. Evaluation of oxidant-antioxidant status in tissue samples in oral cancer: A case control study. *Dent Res J(Isfahan)* 2016;13(2):181-7.
  110. Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2005;65(3):948-56.
  111. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(4):319–26.
  112. Goh J, Enns L, Fatemie S, Hopkins H, Morton J, Pettan-Brewer C, et al. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *B M C Cancer.* 2011;11:191.
  113. de Oliveira VA, da Motta LL, De Bastiani MA, Lopes FM, Müller CB, Gabiatti BP, et al. In vitro evaluation of antitumoral efficacy of catalase in combination with traditional chemotherapeutic drugs against human lung adenocarcinoma cells. *Tumour Biol.* 2016 Aug;37(8):10775-84.
  114. Lam EW, Francis RE, Petkovic M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 5):722-6.
  115. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20589-95.

116. Chung HW, Lim JH, Kim MY, Shin SJ, Chung S, Choi BS, et al. High-fat diet-induced renal cell apoptosis and oxidative stress in spontaneously hypertensive rat are ameliorated by fenofibrate through the PPAR $\alpha$ -FoxO3a-PGC-1 $\alpha$  pathway. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2213-25.
117. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, et al. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem*. 2009;284(21):14476-84.
118. Fritz RD, Varga Z, Radziwill G. CNK1 is a novel Akt interaction partner that promotes cell proliferation through the Akt-FoxO signalling axis. *Oncogene*. 2010;29(24):3575-82.
119. Araujo J, Breuer P, Dieringer S, Krauss S, Dorn S, Zimmermann K, et al. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet*. 2011;20(15):2928-41.
120. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002;419(6904):316-21.
121. Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*. 2015;6:51-72.
122. Xu R, Cho M and Harari S. Genetic and Metabolic Effects of Chemical Carcinogens: A Complex Interplay. *J Clin Exp Pathol* 2013;(S2):e001.
123. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.

124. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010;108: 73-112.
125. Puszynski K, Bertolusso R, Lipniacki T. Crosstalk between p53 and nuclear factor- $\kappa$ B systems: pro- and anti-apoptotic functions of NF- $\kappa$ B. *IET Syst Biol*. 2009;3(5):356-67.
126. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12: 121-132.
127. Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 2):S20–4.
128. Yates MS, Kwak MK, Egner PA, Groopman JD, Bodreddigari S, Sutter TR, et al. Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole. *Cancer Res*. 2006;66(4):2488-94.
129. Strid T, Söderström M, Hammarström S. Leukotriene C4 synthase promoter driven expression of GFP reveals cell specificity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1):80-5.
130. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG. Glutathione metabolism, metabolism of other amino acids. [http://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?pathway+map00480](http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+map00480).
131. Reactome pathway database. Glutathione conjugation. 2014; <http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-156580&SEL=R-HSA->

- 156590&PATH=R-HSA-1430728,R-HSA-211859.
132. Reactome pathway database. Glutathione synthesis and recycling, GST trimers transfer GS from GSH to luminal substrates. 2014; <http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-156580&SEL=R-HSA-174403&PATH=R-HSA-1430728,R-HSA-211859>.
  133. National Center for Biotechnology Information – NCBI, RefSeq. GSR glutathione-disulfide reductase [ Homo sapiens (human) ]. 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2936>.
  134. National Center for Biotechnology Information – NCBI, RefSeq. GPX3 glutathione peroxidase 3 [ Homo sapiens (human) ]. 2016; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2878>.
  135. Neumann CA, Fang Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(4):375-80.
  136. Chang KP, Yu JS, Chien KY, Lee CW, Liang Y, Liao CT, et al. Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology. *J Proteome Res.* 2011;10(11):4935-47.
  137. Peng H, Chen Y, Gong P, Cai L, Lyu X, Jiang Q, et al. Higher methylation intensity induced by EBV LMP1 via NF-kB/ DNMT3b signaling contributes to silencing of PTEN gene. *Oncotarget.* 2016; 7(26): 40025-37.
  138. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009;9:188.
  139. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and

- potential therapeutic targets in human cancer, *Journal of clinical oncolog. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27 2009; 528 - 297.
140. Moeller LC, Führer D. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(2):R19-29.
141. Roy K, Wu Y, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Jiang G, et al. NADPH oxidases and cancer. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):863-75.
142. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 2000;275(30):23227-33.
143. Fischer H. Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2453-65.
144. Reactome pathway database. Thyroxine biosynthesis, DUOX1, 2 reduce O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 2015; <http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-209776&SEL=R-HSA-5693681&PATH=R-HSA-1430728,R-HSA-71291>.
145. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9.
146. Ling Q, Shi W, Huang C, Zheng J, Cheng Q, Yu K, et al. Epigenetic silencing of dual oxidase 1 by promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 2014;4:508-517.
147. Luxen S, Belinsky SA, Knaus UG. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer. *Cancer Res* 2008;68: 1037-1045.
148. Pulcrano M, Boukheris H, Talbot M, Caillou B, Dupuy C, Virion A, et al. Poorly differentiated follicular thyroid carcinoma: Prognostic factors and relevance of histological classification. *Thyroid* 2007;17: 639-646.

149. Qi R, Zhou Y, Li X, Guo H, Gao L, Wu L, et al. DUOX2 Expression Is Increased in Barrett Esophagus and Cancerous Tissues of Stomach and Colon. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:1835684.
150. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):951-65.
151. Reactome pathway database. Selenoamino acid metabolism, metabolism of ingested H<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> and 2SeO<sub>3</sub> into H<sub>2</sub>Se: GSSeSG (selenodiglutathione) is reduced to GSSeH (gluthathioselenol) and GSH by GSR. 2015; <http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-2408522&SEL=R-HSA-2408542&PATH=R-HSA-1430728,R-HSA-71291>.
152. Björnstedt M, Kumar S, Holmgren A. Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 1992;267(12):8030-4.
153. Mittag J, Behrends T, Hoefig CS, Vennström B, Schomburg L. Thyroid Hormones Regulate Selenoprotein Expression and Selenium Status in Mice. Vina J, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(9):e12931. doi:10.1371/journal.pone.0012931.
154. Chen X, Wang S, Wu N, Yang CS. Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4(3):267-83.
155. Romano M, Chen XS, Takahashi Y, Yamamoto S, Funk CD, Serhan CN. Lipoxin synthase activity of human platelet 12-lipoxygenase. *Biochem J*. 1993;296(Pt 1):127-33.
156. Honn KV, Tang DG, Gao X, Butovich IA, Liu B, Timar J, et al. 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1994;13(3-4):365-96.



157. Hussain H, Shornick LP, Shannon VR, Wilson JD, Funk CD, Pentland AP, et al. Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis. *Am J Physiol.* 1994;266:C243–53.
158. Liagre B, Vergne P, Rigaud M, Beneytout JL. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Lett.* 1997;414:159–64.
159. Virmani J, Johnson EN, Klein-Szanto AJ, Funk CD. Role of ‘platelet-type’ 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2001;162:161–5.
160. Dilly AK, Ekambaram P, Guo Y, Cai Y, Tucker SC, Fridman R, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase induces MMP9 expression and cellular invasion via activation of PI3K/Akt/NF-kappaB. *Int J Cancer.* 2013;133:1784–91.
161. Nie D, Hillman GG, Geddes T, Tang K, Pierson C, Grignon DJ, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 1998;58:4047–51.
162. Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, et al. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol.* 1992;168(3):257-62.
163. Vukanovic J, Isaacs JT. Human prostatic cancer cells are sensitive to programmed (apoptotic) death induced by the antiangiogenic agent linomide. *Cancer Res.* 1995;55(16):3517-20.
164. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec19-26;420(6917):860-7.
165. Zhang D, Ai D, Tanaka H, Hammock BD, Zhu Y. DNA methylation of the promoter of soluble epoxide hydrolase silences its expression by an SP-1-

- dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(9):659-67.
166. Grigo K, Wirsing A, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU. HNF4 alpha orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. *Biol Chem*. 2008;389(2):179-87.
167. Enayetallah AE, French RA, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *J Mol Histol*. 2006;37(3-4):133-41.
168. Newman JW, Morisseau C, Harris TR, Hammock BD. The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb;100(4):1558-63.
169. Khammanivong A, Anandharaj A, Qian X, Song JM, Upadhyaya P, Balbo S, et al. Transcriptome profiling in oral cavity and esophagus tissues from (S)-N'-nitrosornicotine-treated rats reveals candidate genes involved in human oral cavity and esophageal carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2016 Jan 19.
170. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-45.
171. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife*. 2015;4:e07999.
172. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, et al. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 2001;69(4):685-94.

173. Nagai MA, Ros N, Bessa SA, Mourão Neto M, Miracca EC, Brentani MM. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *Int J Oncol.* 2003;23(5):1425-30.
174. Nelson PS. Identifying immunotherapeutic targets for prostate carcinoma through the analysis of gene expression profiles. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;975:232-46.
175. Bonaccorsi L, Luciani P, Nesi G, Mannucci E, Deledda C, Dichiara F et al. Androgen receptor regulation of the seladin-1/DHCR24 gene: altered expression in prostate cancer. *Lab Invest.* 2008;88(10):1049-56.
176. Di Stasi D, Vallacchi V, Campi V, Ranzani T, Daniotti M, Chiodini E, et al. DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Cancer.* 2005;115(2):224-30.
177. Kuehnle K, Cramer A, Kälin RE, Luciani P, Benvenuti S, Peri A, et al. Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2008;28(2):539-50.
178. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature.* 2004 Dec;432(7017):640-5.
179. Greeve I, Hermans-Borgmeyer I, Brellinger C, Kasper D, Gomez-Isla T, Behl C, et al. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidativestress. *J Neurosci.* 2000;20(19):7345-52.
180. Wu BJ, Chen K, Shrestha S, Ong KL, Barter PJ, Rye KA. High-density

- lipoproteins inhibit vascular endothelial inflammation by increasing 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta$ 24 reductase expression and inducing heme oxygenase-1. *Circ Res.* 2013;112(2):278-88.
181. McGrath KC, Li XH, Puranik R, Liong EC, Tan JT, Dy VM, et al. Role of 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta$ 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):877-82.
182. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13363-83.
183. Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* 2010;290(1):1-23.
184. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008;31:439-477.
185. Bakkebo MK, Mouillet-Richard S, Espenes A, Goldmann W, Tatzelt J, Tranulis MA. The cellular prion protein: a player in immunological quiescence. *Front. Immunol.* 2015;6:450.
186. Barbieri G, Palumbo S, Gabrusiewicz K, Azzalin A, Marchesi N, Spedito A, et al. Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy* 2011;7:840-53.
187. Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, LeBlanc A. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ.* 2005;12:783-795.
188. Meslin F, Hamai A, Gao P, Jalil A, Cahuzac N, Chouaib S, et al. Silencing of

- prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res.* 2007;67:10910-10919.
189. Sauer H, Dagdanova A, Hescheler J, Wartenberg M. Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:1276-1283.
190. Du J, Pan Y, Shi Y, Guo C, Jin X, Sun L, Liu N, Qiao T, Fan D. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *Int J Cancer.* 2005;113(2):213-20.
191. Antonacopoulou AG, Grivas PD, Skarlas L, Kalofonos M, Scopa CD, Kalofonos HP. POLR2F, ATP6V0A1 and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance? *Anticancer Res.* 2008;28(2B):1221-7.
192. Li C, Yu S, Nakamura F, Yin S, Xu J, Petrolla AA, et al. Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2725-36.
193. Sollazzo V, Galasso M, Volinia S, Carinci F. Prion proteins (PRNP and PRND) are over-expressed in osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2012 Jun;30(6):1004-12.
194. Yap YH, Say YH. Resistance against tumour necrosis factor  $\alpha$  apoptosis by the cellular prion protein is cell-specific for oral, colon and kidney cancer cell lines. *Cell Biol Int.* 2012;36(3):273-7.
195. Déry MA, Jodoin J, Ursini-Siegel J, Aleynikova O, Ferrario C, Hassan S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013;15(2):R22
196. Gil M, Kim YK, Kim KE, Kim W, Park CS, Lee KJ. Cellular prion protein regulates invasion and migration of breast cancer cells through MMP-9

- activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(1):213-9.
197. Yap YH, Say YH. Resistance against apoptosis by the cellular prion protein is dependent on its glycosylation status in oral HSC-2 and colon LS 174T cancer cells. *Cancer Lett.* 2011;306(1):111-9.
198. Chieng CK, Say YH. Cellular prion protein contributes to LS 174T colon cancer cell carcinogenesis by increasing invasiveness and resistance against doxorubicin-induced apoptosis. *Tumour Biol.* 2015;36(10):8107-20.
199. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 1989;264(24):13963-6
200. Allen EM, Mieyal JJ. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(12):1748-63.
201. Hashemy SI, Johansson C, Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14428-36.
202. Pan S, Berk BC. Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circ Res.* 2007;100(2):213-9.
203. Anathy V, Aesif SW, Guala AS, Havermans M, Reynaert NL, Ho YS, et al. Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas. *J Cell Biol.* 2009 ;184(2):241-52.
204. Jeffers M, Paciucci R, Pellicer A. Characterization of unr; a gene closely linked to N-ras. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(16):4891-9.
205. Anderson EC, Catnaigh PÓ. Regulation of the expression and activity of Unr in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 2015 Dec;43(6):1241-6.

- 
206. Pai R, Pai S, Lalitha R, Kumaraswamy S, Lalitha N, Johnston R, et al. Over-expression of c-Myc oncoprotein in oral squamous cell carcinoma in the South Indian population. *Ecancermedicalsecience*. 2009;3:128.
  207. National Center for Biotechnology Information – NCBI, RefSeq. OXSR1 oxidative stress responsive 1 [ Homo sapiens (human) ]. 2008; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9943>.
  208. Kozlov SV, Waardenberg AJ, Engholm-Keller K, Arthur JW, Graham ME, Lavin M. Reactive Oxygen Species (ROS)-Activated ATM-Dependent Phosphorylation of Cytoplasmic Substrates Identified by Large-Scale Phosphoproteomics Screen. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(3):1032-47.
  209. Dbouk HA, Weil LM, Perera GK, Dellinger MT, Pearson G, Brekken RA, et al. Actions of the protein kinase WNK1 on endothelial cells are differentially mediated by its substrate kinases OSR1 and SPAK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):15999-6004.
  210. Rauch TA, Wang Z, Wu X, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol*. 2012;33(2):287-96.
  211. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 1988 Apr 8;53(1):3-4.
  212. Cusick JK, Xu LG, Bin LH, Han KJ, Shu HB. Identification of RELT homologues that associate with RELT and are phosphorylated by OSR1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):535-43.
  213. Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem*. 1984;259(1):686-91.

214. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.





**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 466/12)

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.

## 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.....Tipo.....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 (mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor – 30 mL; copo de vinho – 102 mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja – 340 mL)

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

**História Familiar de Neoplasias:**.....

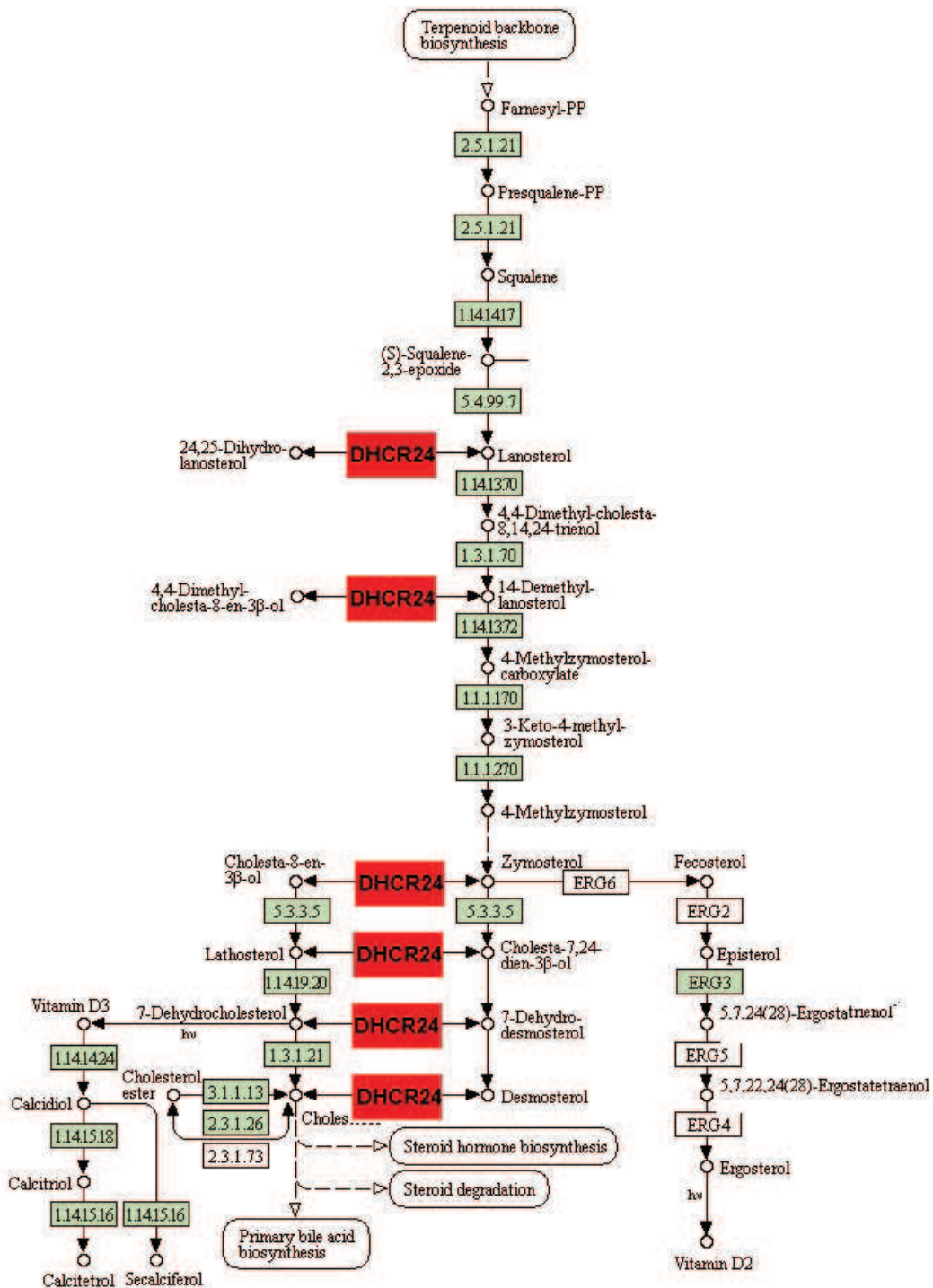
Heredograma no verso.

Responsável pela entrevista:

.....

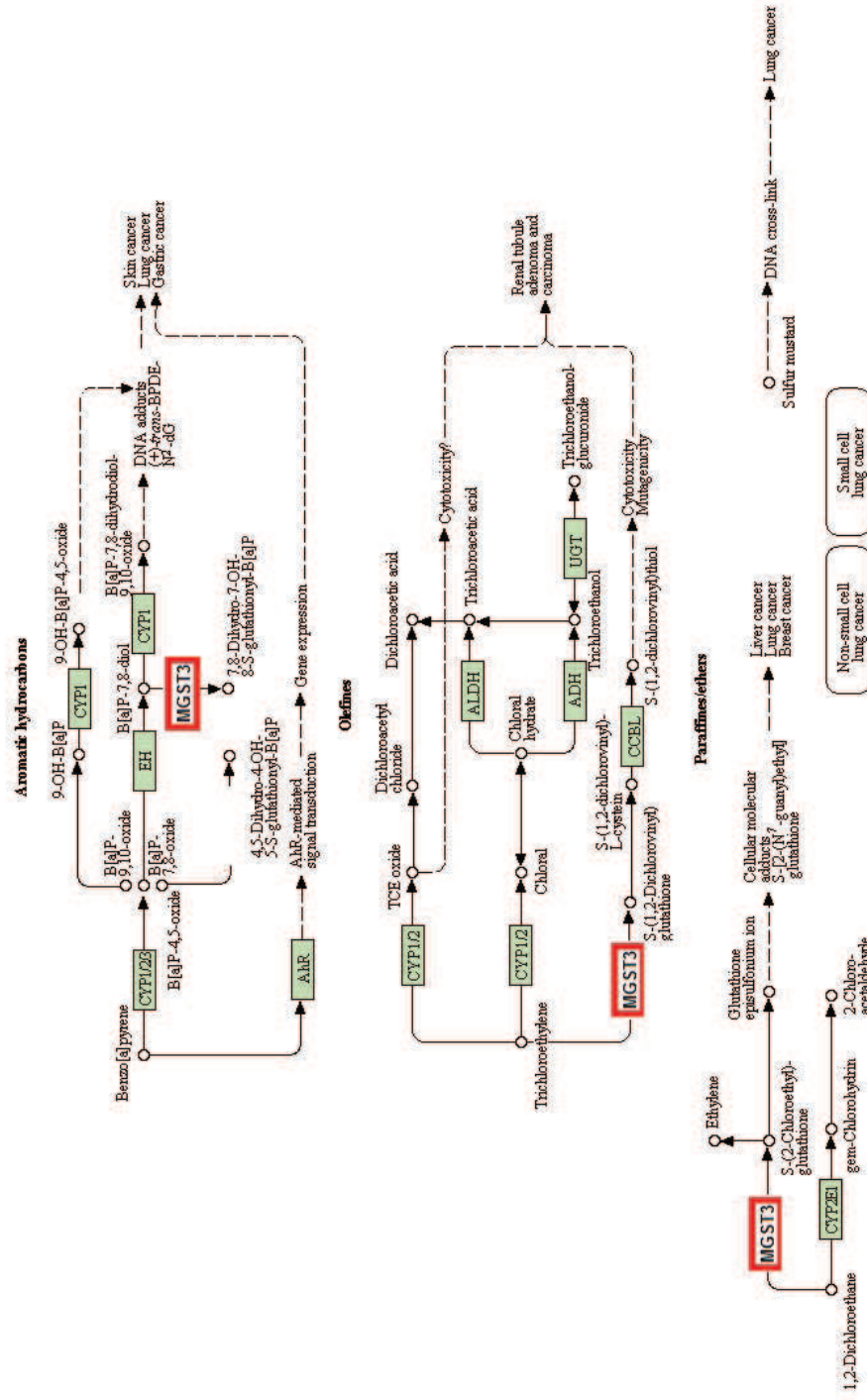
### 3. Esquemas dos Processos Biológicos

#### 3.1. Biossíntese de Esteróides



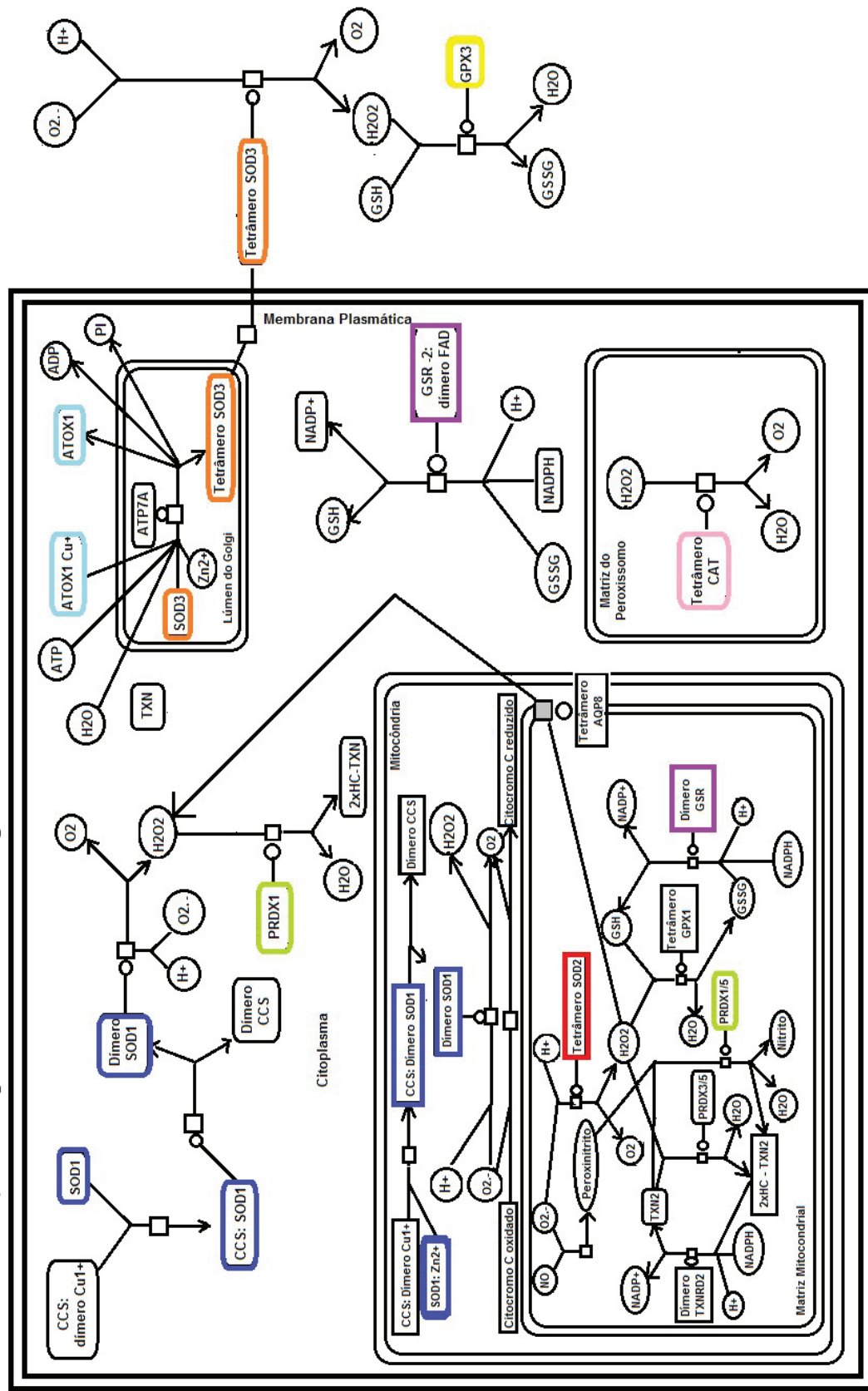
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00100+1718](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00100+1718)).

### 3.2. Carcinogênese Química



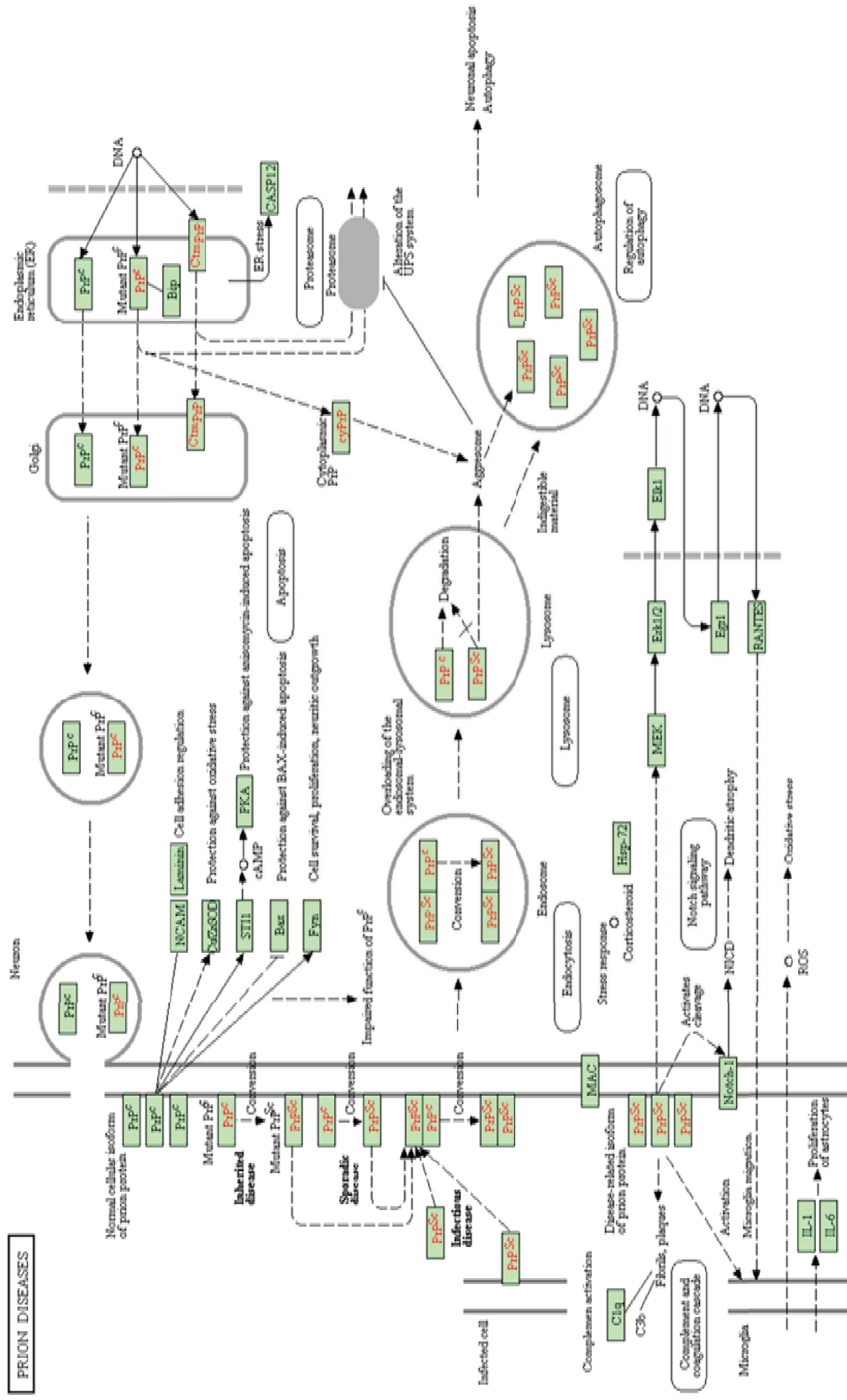
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00100+1718](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00100+1718)).

### 3.3. Detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio



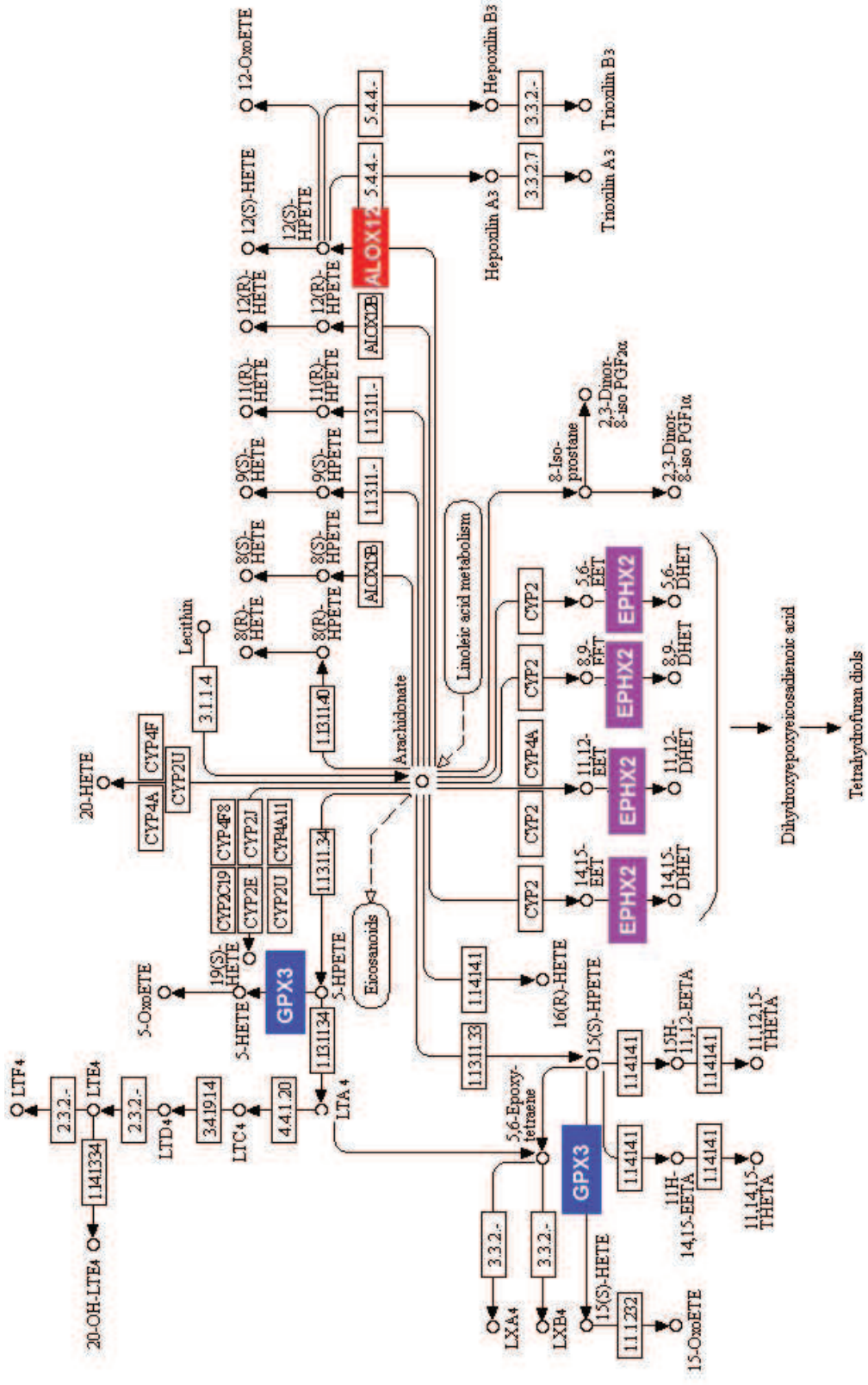
Adaptado: REACTOME (<http://www.reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-3299685&PATH=R-HSA-2262752>).

### 3.4. Doenças Priônicas



Fonte: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa05020](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05020)).

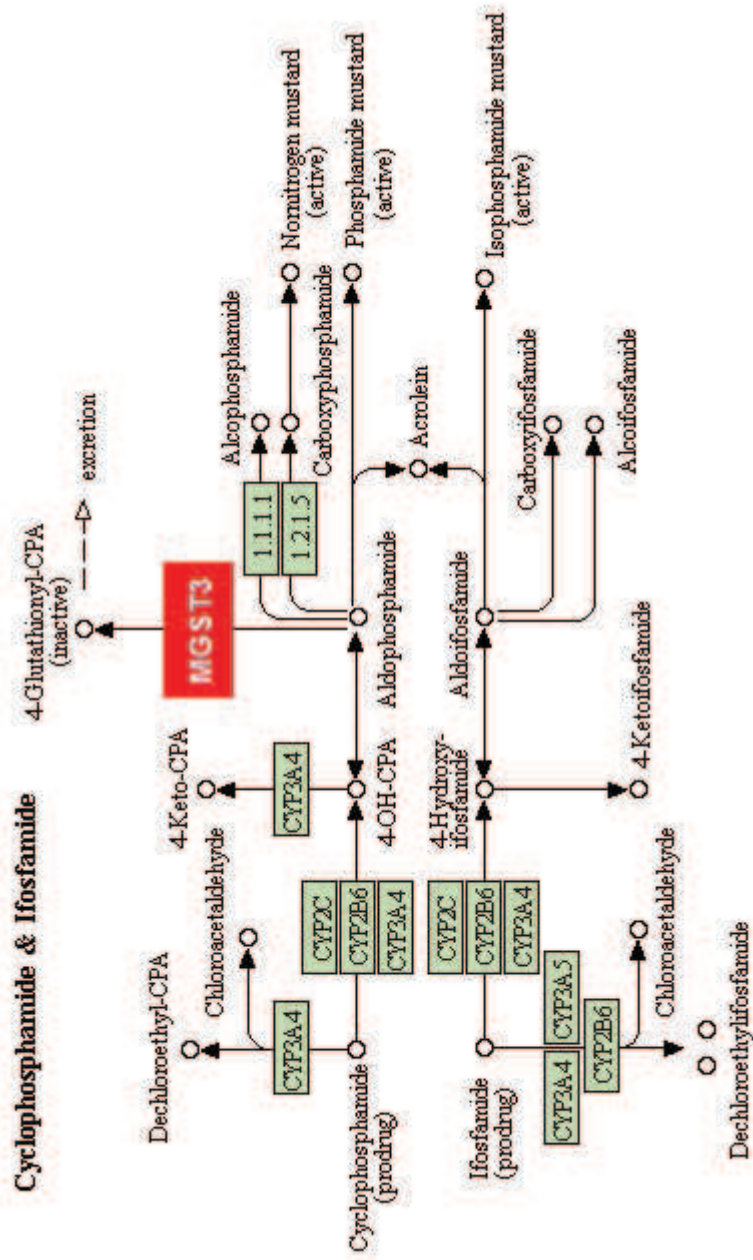
### 3.5. Metabolismo do Ácido Araquidônico



Adaptado: KEGG ([http://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=hsa&mapno=00590&mapscale=1.0&show\\_description=hide](http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=hsa&mapno=00590&mapscale=1.0&show_description=hide)).

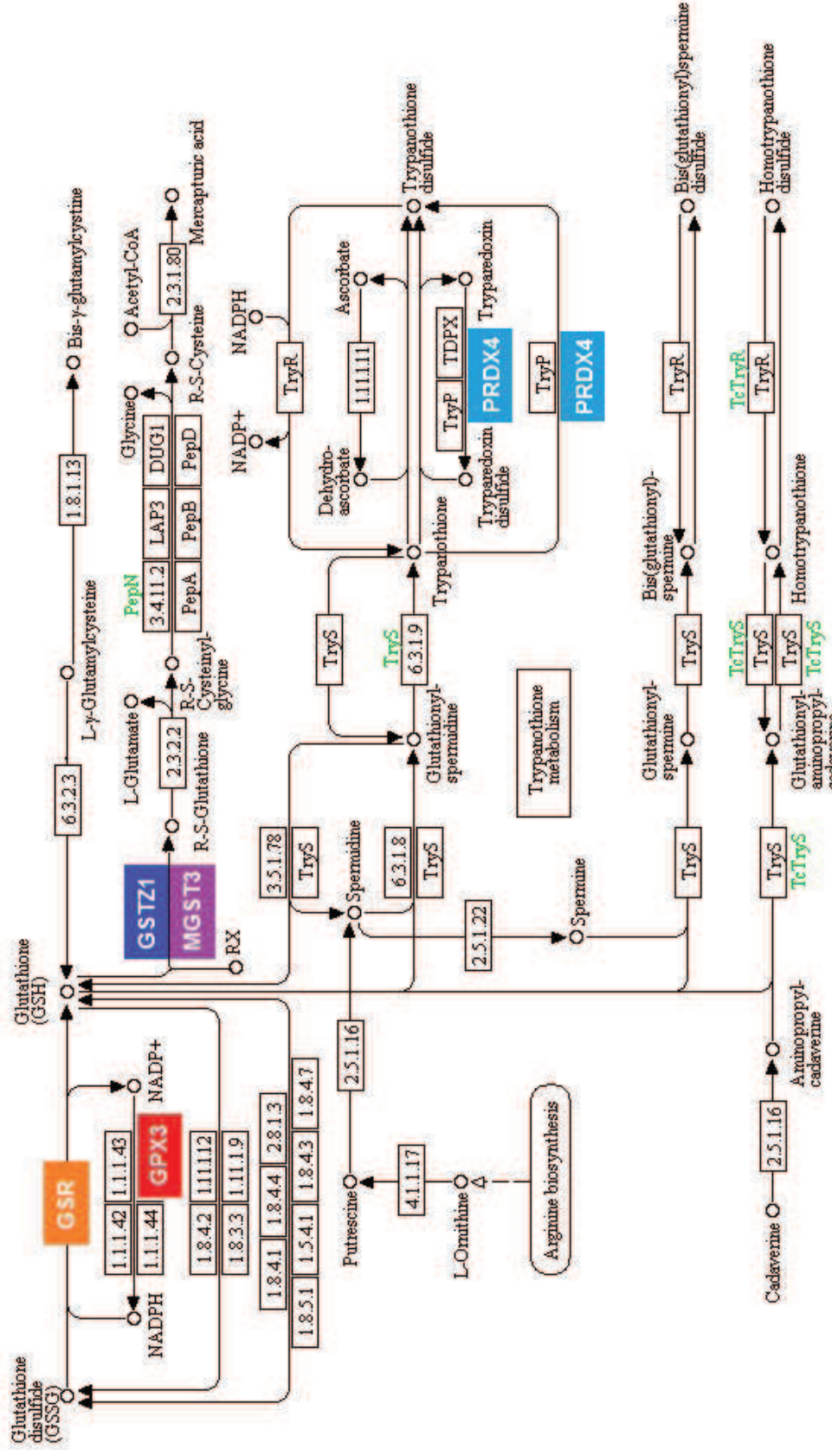


### 3.6. Metabolismo de drogas por Citocromo P450



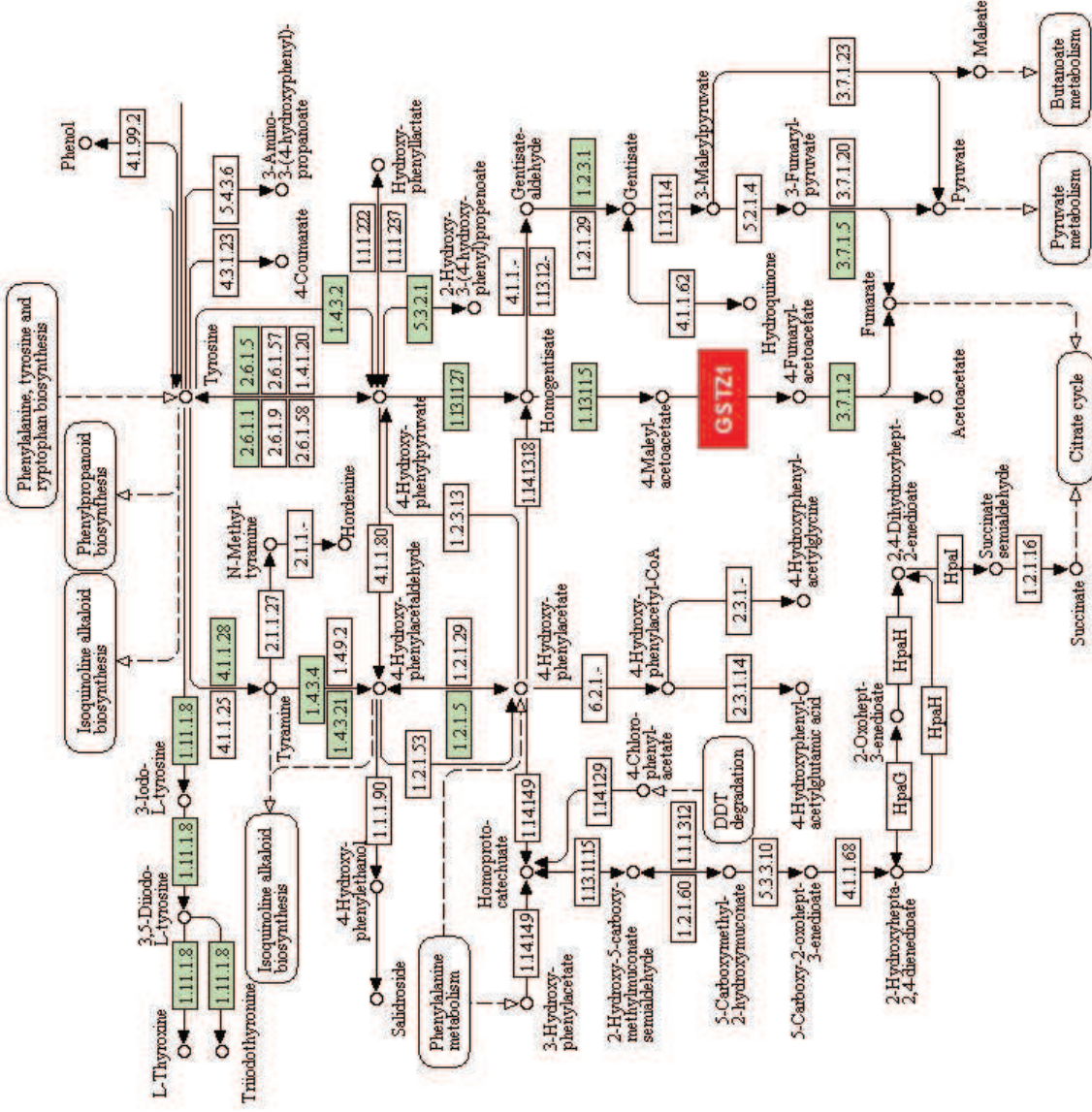
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00982+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00982+4259)).

### 3.7. Metabolismo da Glutathiona



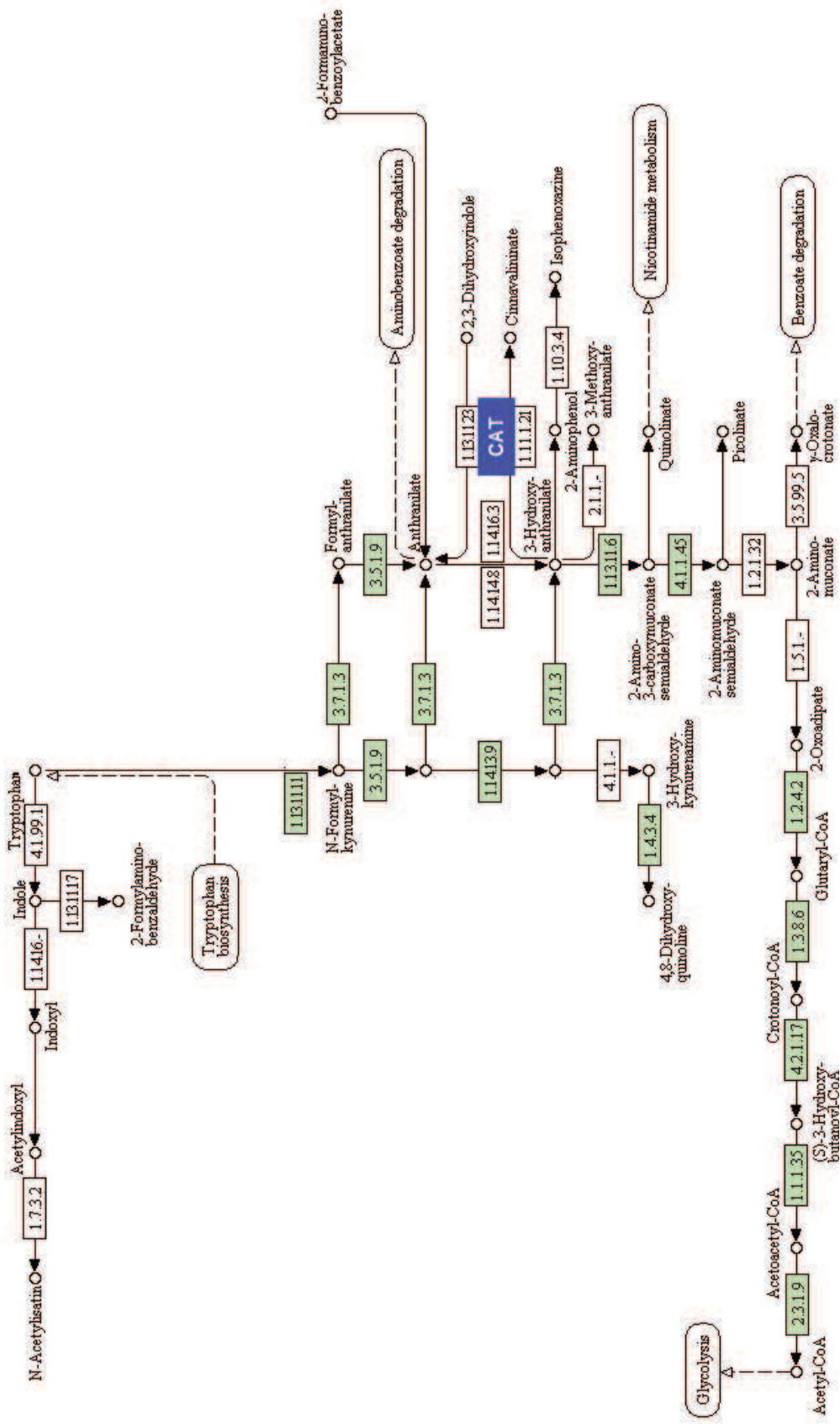
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00480](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00480)).

3.8. Metabolismo da Tirosina



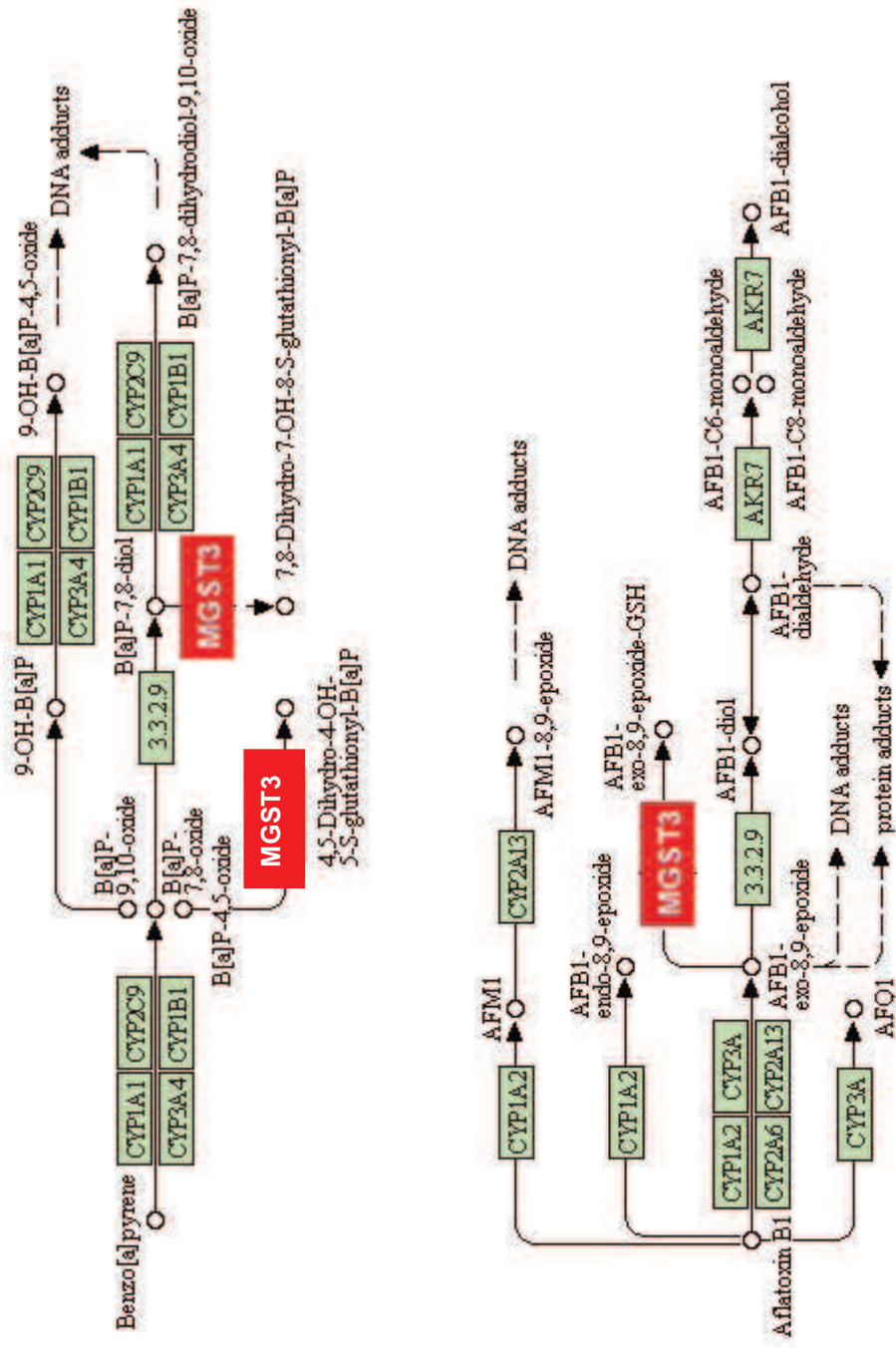
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00350+2954](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00350+2954)).

### 3.9. Metabolismo do Triptofano



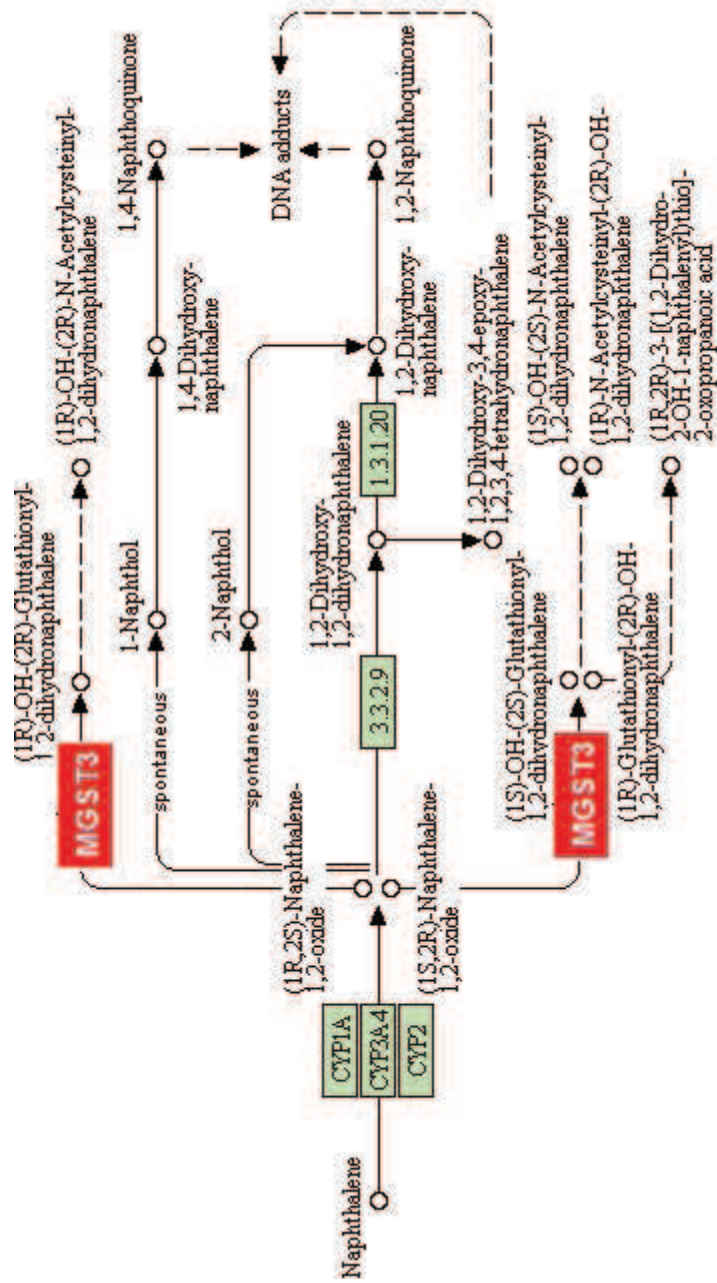
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00380+847](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00380+847)).

### 3.10.1. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450



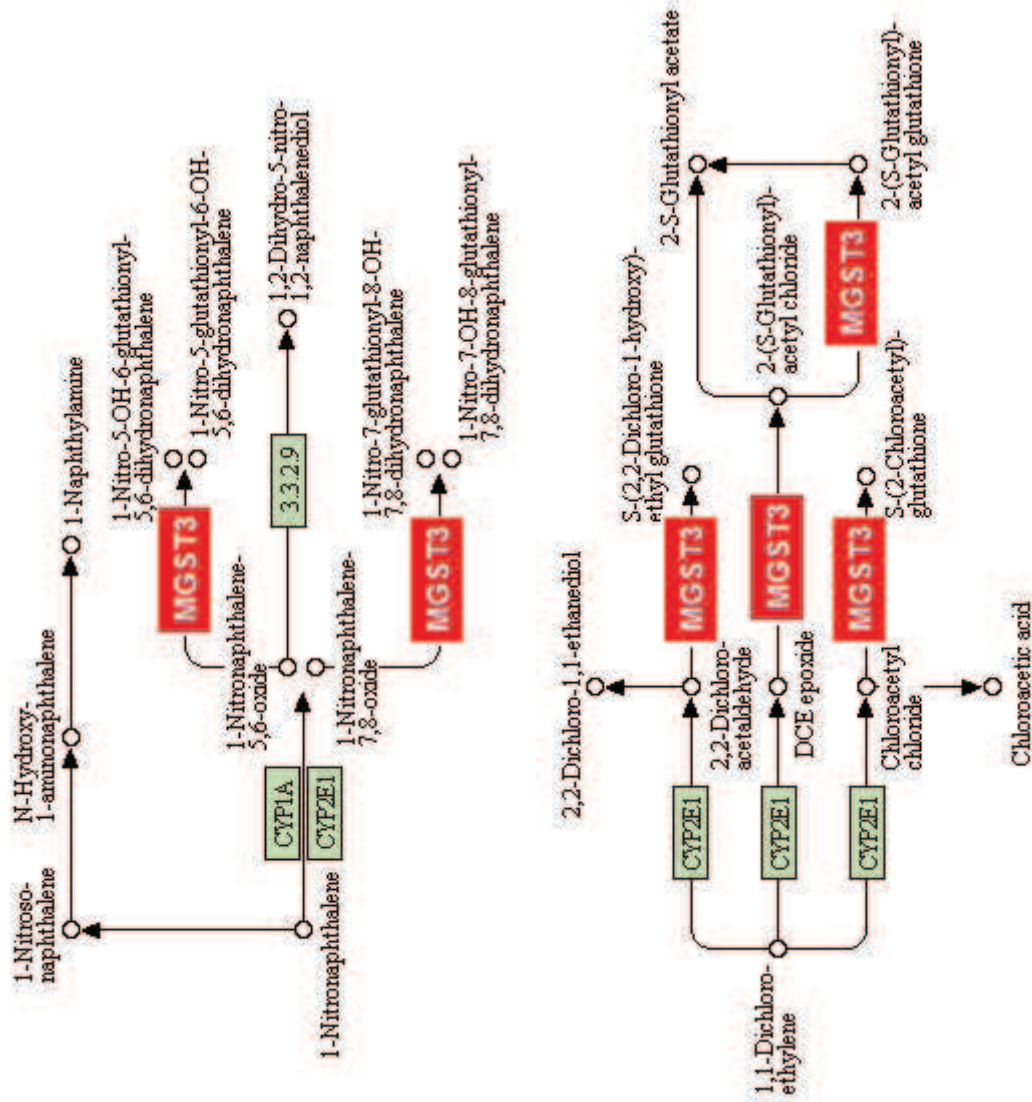
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00980+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00980+4259)).

### 3.10.2. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450



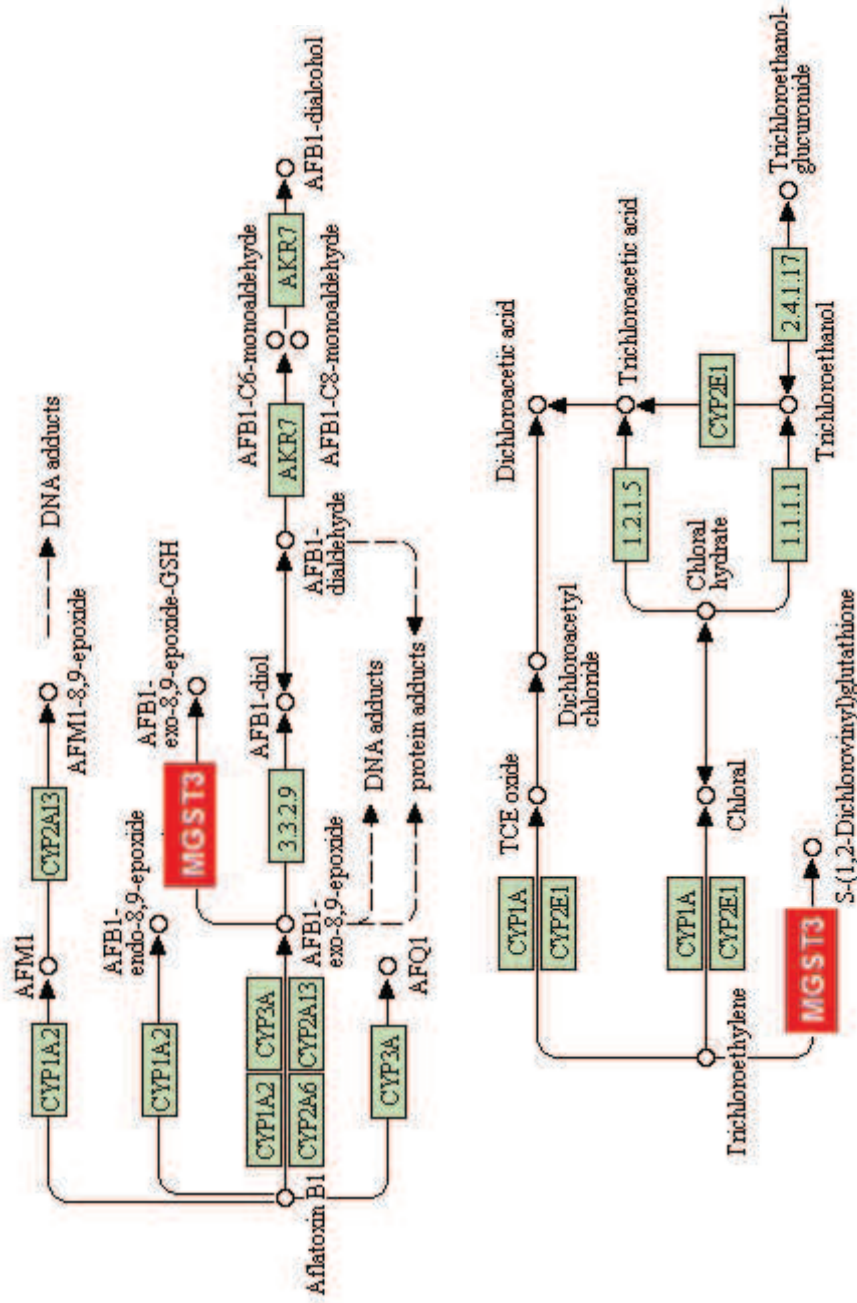
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00980+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00980+4259)).

### 3.10.3. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450



Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00980+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00980+4259)).

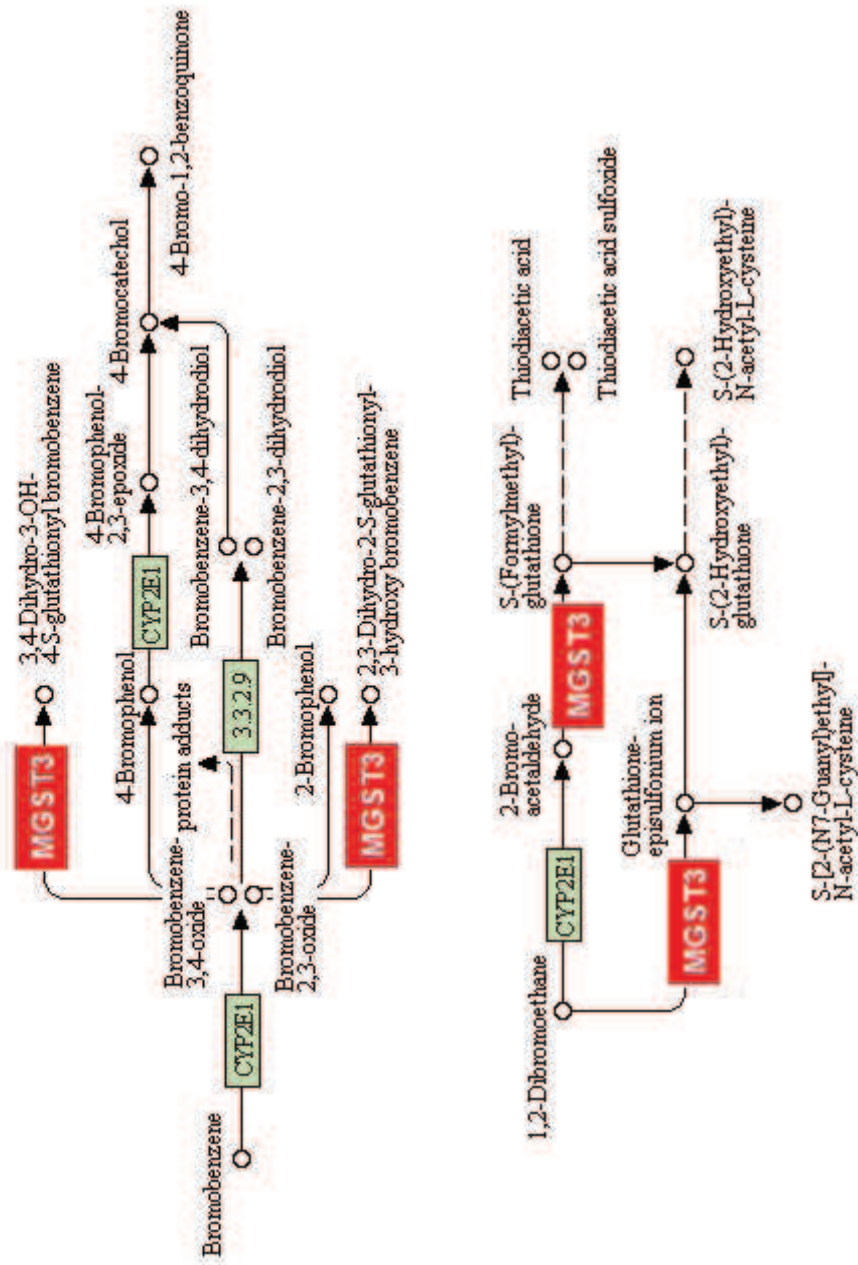
### 3.10.4. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450



Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00980+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00980+4259)).

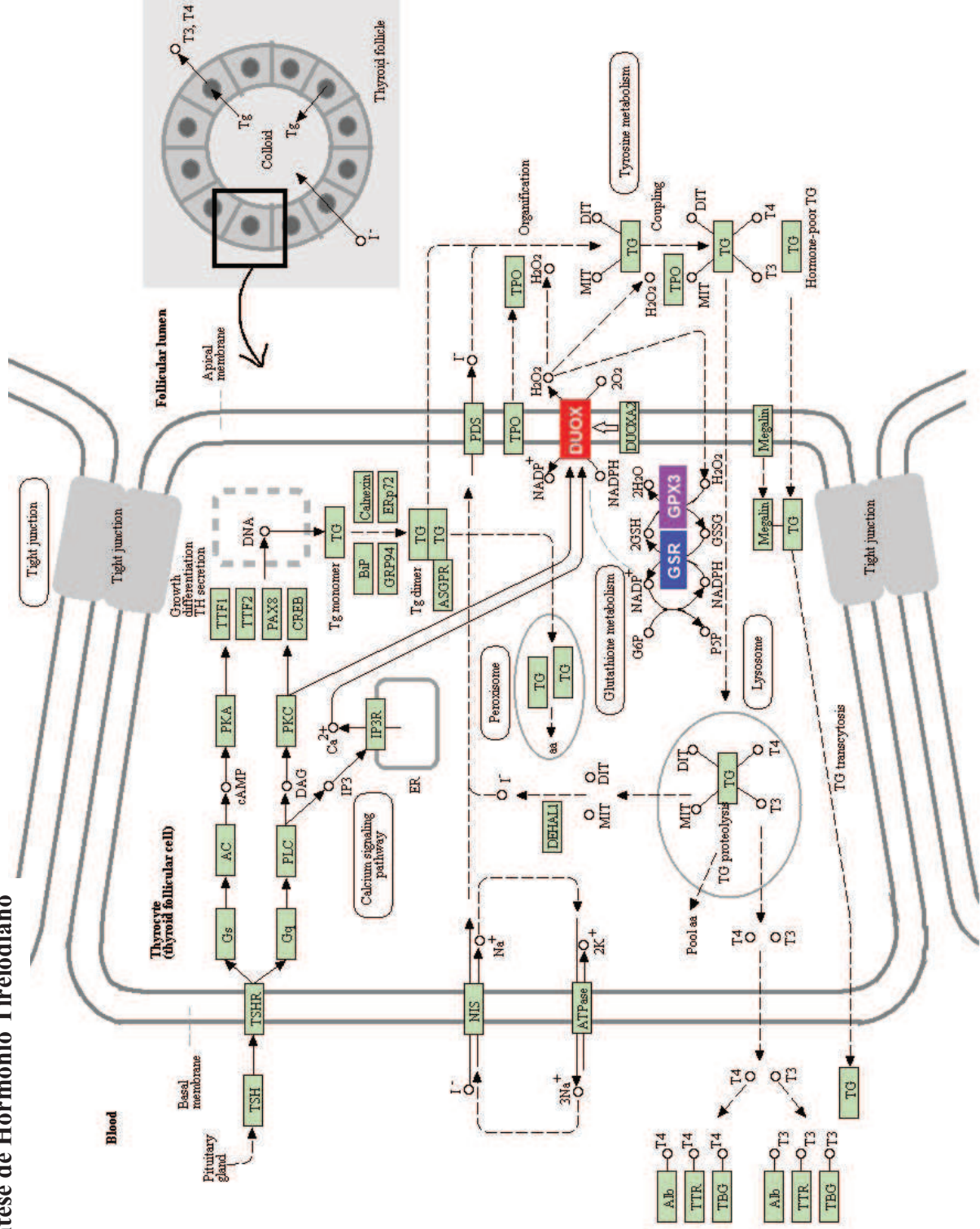


### 3.10.5. Metabolismo de Xenobióticos por Citocromo P450



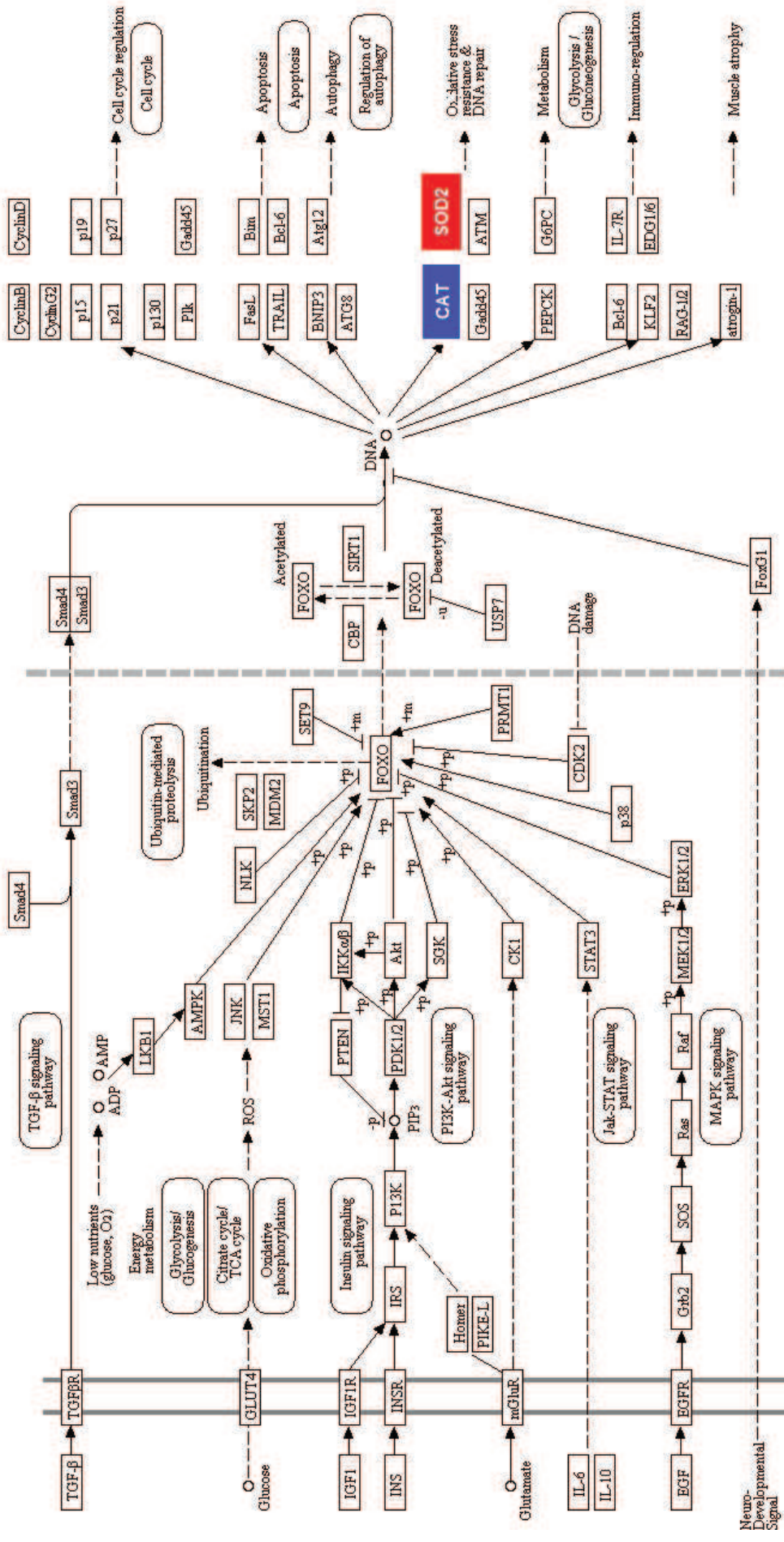
Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa00980+4259](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00980+4259)).

### 3.11. Síntese de Hormônio Tireoidiano



Adaptado: KJ

### 3.12. Via de sinalização FoxO



Adaptado: KEGG ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map04068](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map04068)).