



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**ADRIANA ROCHA DE CARIS**

**EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS  
METABOLIZADORAS DE DROGAS NO CARCINOMA DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA EM PACIENTES  
JOVENS**

2014

**ADRIANA ROCHA DE CARIS**

**EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS METABOLIZADORAS DE  
DROGAS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA EM  
PACIENTES JOVENS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Estela Kaminagakura Tango  
Co-orientador: Dr. Luiz Paulo Kowalski

São José dos Campos  
2014

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estela Kaminagakura Tango**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup>.Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Adj. Ademar Takahama Junior**

Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal Fluminense  
Pólo Universitário de Nova Friburgo

São José dos Campos, 29 de outubro de 2014.

## DEDICATÓRIA

*À Deus, por toda sua misericórdia e por ter me fortalecido nessa jornada.*

*Aos meus pais, **Arnaldo** (in memoriam) e **Nilda**, pelo amor, dedicação e por tudo que me ensinaram. Vocês são meu exemplo de caráter e humildade.*

*Não há palavras suficientes para agradecer-lhes.*

*À minha querida irmã **Tatiana**, pelo carinho e por compartilhar comigo seus sorrisos.*

*Ao meu companheiro **Fernando**, por ser meu amor, meu amigo, pelo seu carinho e apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli**, e do vice-diretor **Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara**.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira**.

Ao **Hospital AC Camargo** pelo desenvolvimento de parte desta pesquisa.

À Divisão de Odontologia – GIA-SJ – Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), na pessoa do Chefe **Maj Dent Guilherme Ribeiro Martins**, por me permitir conciliar o mestrado e o trabalho.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango**, pela dedicação, amizade e paciência.

Ao meu co-orientador, **Dr. Luiz Paulo Kowalski**, por seu conhecimento transmitido.

À querida **Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**, pelos ensinamentos transmitidos fundamentais para a realização do meu mestrado, pelo carinho, apoio e motivação sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À amiga, **Adriana Delgado**, cuja contribuição foi indispensável em todas as etapas laboratoriais deste trabalho.

As amigas da pós-graduação do ICT-UNESP, em especial **Renata, Milagros, Lara e Vivian**, pela amizade e companheirismo.

A amiga da pós-graduação do Hospital AC Camargo **Juliana Bartholo de Andrade**, por toda ajuda técnica.

À **Aline Damascena**, estatística do Hospital AC Camargo, responsável pela análise deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	09
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 Carcinoma de células escamosas de boca</b> .....	13
<b>2.2 Carcinógenos</b> .....	16
2.2.1 Tabaco.....	16
2.2.2 Álcool.....	21
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>4.1 Análise clinicopatológica</b> .....	27
<b>4.2 Construção do <i>Tissue microarray</i> (TMA)</b> .....	28
<b>4.3 Avaliação preliminar</b> .....	29
<b>4.4 Imuno-histoquímica</b> .....	29
<b>4.5 Análise dos resultados</b> .....	30
4.5.1 Análise imuno-histoquímica.....	30
4.5.2 Análise estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	33
<b>5.1 Análise clinicopatológica</b> .....	33
<b>5.2 Análise imuno-histoquímica</b> .....	35
<b>5.3 Análise do prognóstico dos pacientes</b> .....	56
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	87
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>APÊNDICES</b> .....	96
<b>ANEXOS</b> .....	104

Caris AR. Expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas no carcinoma de células escamosas de boca em pacientes jovens [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas de boca (CCE) acomete principalmente fumantes e etilistas crônicos entre a 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> décadas de vida, sendo relativamente raro em pacientes jovens ( $\leq 40$  anos de idade). Na literatura, não há relato a respeito da expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas em CCE de boca neste grupo etário. A indução da expressão destas enzimas resulta na aceleração da detoxificação de substâncias tóxicas como também no aumento de metabólitos xenobióticos, e conseqüentemente maior risco de dano ao DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica das enzimas envolvidas no processo de biotransformação do tabaco (CYP1A1 e CYP1B1) e do álcool (ALDH1 e ALDH2), entre os grupos teste (jovens  $\leq 40$  anos) e controle ( $\geq 50$  anos), através da técnica de imuno-histoquímica em microarranjo de tecido (*Tissue Microarray*), e correlacionar estes resultados com as características clinicopatológicas e com o prognóstico dos pacientes. Foram avaliados 41 CCE primários de boca em pacientes jovens, coletados no período de 1970 a 2007, no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo de São Paulo. Estes casos foram comparados com 59 controles que apresentam tumores em estádios clínicos e topografias similares. As variáveis entre os grupos foram comparadas através do teste  $\chi^2$ . A expressão dos marcadores foi comparada entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney. Nas análises de sobrevida global, doença específica e livre de doença, as expressões dos marcadores foram dicotomizadas de acordo com a mediana. Gráficos de Kaplan-Meier foram construídos e o teste de logrank foi utilizado. O nível de confiança adotado foi de 5%. Os resultados revelaram que houve uma predominância de pacientes do gênero masculino, leucoderma, tabagista e etilista, com tumores localizados em língua, bem diferenciados e em estágio clínico avançado, sem diferença entre os grupos. Na análise imuno-histoquímica verificou-se que houve diferença estatística apenas para o anticorpo CYP1B1 ( $p < 0,001$ ), a expressão desta proteína foi maior nos pacientes do grupo controle. A hiperexpressão das enzimas estudadas foi observada, predominantemente, nos pacientes tabagistas. A sobrevida global e a sobrevida doença específica não diferiram entre o

grupo que expressa os marcadores estudados e o grupo em que não há expressão ( $p > 0,05$ ). A sobrevida livre de recidiva revelou diferença entre o grupo que apresentou imunoexpressão da CYP1B1 e da ALDH1, e o grupo em que não há expressão ( $p < 0,05$ ). Quanto maior a expressão destas enzimas, maior a sobrevida livre de recidiva, sugerindo que haja maior metabolização dos carcinógenos por estas enzimas, podendo ajudar evitar possíveis recidivas do CCE de boca.

Palavras-chave: Adulto jovem. Aldeído desidrogenase. Citocromo P450. CYP. ALDH.

Caris AR. Protein expression of drug-metabolizing enzymes in oral squamous cell carcinoma in young patients [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

## **ABSTRACT**

The oral squamous cell carcinoma (SCC) mainly affects smokers and chronic alcoholics between the fifth and sixth decades of life and it's relatively rare in young patients ( $\leq 40$  years old). In the literature, there is no report regarding the protein expression of drug metabolizing enzymes in oral SCC in this age group. The induction of expression of these enzymes results in the acceleration of detoxification of toxic substances as well as in the increase of metabolites of xenobiotics and more risk of damage to AND consequently. The aim of this study was to evaluate the protein expression of enzymes involved in the biotransformation of tobacco (CYP1A1 and CYP1B1) and alcohol (ALDH1 and ALDH2) between test group (young  $\leq 40$  years) and control group ( $\geq 50$  years) by the immunohistochemistry technique on tissue microarray and to correlate the results with the clinicopathologic features and prognosis of patients. Forty-one primary oral SCC were evaluated in young patients, collected in the period 1970-2007, in the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, AC Camargo Hospital, Sao Paulo. These cases were compared with 59 controls with tumors in clinical stages and similar topographies. Variables between groups were compared using the  $\chi^2$  test. The expression of the markers was compared between groups by the Mann-Whitney test. In the analysis of overall survival, disease-specific and disease-free, the expressions of the markers were dichotomized according to the median. Kaplan-Meier graphs were constructed and the log rank test was used. The confidence level adopted was 5%. The results revealed that there was a predominance of male patients, leucoderma, smoker and drinker, with tumors located in the tongue, rather differentiated and advanced stage, without difference between the groups. In immunohistochemical analysis it was found that there was a statistical difference only for CYP1B1 ( $p < 0.001$ ) antibody, the expression of this protein was higher in patients of the control group. The overexpression of the studied enzymes was observed predominantly in smokers. Overall survival and specific disease survival did not differ between the group that expresses the studied markers and the group in which there is no expression ( $p > 0.05$ ). The relapse-free survival revealed difference

*between the group that showed immunostaining of CYP1B1 and ALDH1 and the group in which there is no expression ( $p < 0.05$ ). The higher expression of these enzymes, the higher relapse-free survival, suggesting that there is increased metabolism of carcinogens by these enzymes, what can help prevent possible recurrence of oral SCC.*

*Keywords: Young adult. Aldehyde dehydrogenase. Cytochrome P450. CYP. ALDH.*

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) de boca acomete principalmente homens entre a quinta e sexta décadas de vida. É raro em pacientes com menos de 45 anos de idade, representando de 6% a 8% de todos os CCEs de boca diagnosticados (Llewellyn et al., 2001, 2003; Johnson et al., 2005; Sasaki et al., 2005).

Um aumento importante na incidência de CCE de boca em jovens tem sido relatado, sugerindo que este pode ser um tipo diferente de câncer, devido ao seu comportamento biológico aparentemente mais agressivo, porém, isso ainda é controverso (Kuriakose et al., 1992). Há também evidências que sugerem a ausência dos tradicionais fatores de risco para seu desenvolvimento (Manuel et al., 2003; Popovtzer et al., 2004; Llewellyn et al., 2004; Sasaki et al., 2005).

Dentre os fatores etiológicos, o tabaco e o álcool estão relacionados com o surgimento do CCE de boca em pacientes acima de 50 anos de idade, porém suas contribuições para o aparecimento desta neoplasia em jovens parecem ser pequenas (Llewellyn et al., 2004; Johnson et al., 2005). A capacidade de metabolizar componentes prejudiciais resultantes do tabaco e álcool pode variar em seres humanos (Toner, O'Regan, 2009).

A indução da expressão de enzimas metabolizadoras de drogas, como o tabaco e o álcool, resulta na aceleração da detoxificação de substâncias tóxicas como também no aumento de metabólitos xenobióticos, e conseqüentemente risco maior de dano ao DNA (Takiguchi et al., 2010).

A família do citocromo P450 (CYP) é o maior e mais importante grupo de enzimas que metabolizam as drogas que ativam pró-

mutagênicos. Particularmente, a subfamília CYP1 catalisa a ativação metabólica dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) presentes na fumaça de cigarros (Nebert, 1991).

O metabólito primário do etanol, o acetaldeído, é um candidato plausível para o efeito carcinogênico de bebidas alcoólicas. O acetaldeído é catalisado pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Boffetta, Hashibe, 2006). Na mucosa oral, o álcool age como um solvente, aumentando a exposição aos agentes mutagênicos, permitindo a sua captação pelas células epiteliais (Brunotto et al., 2014).

Não há consenso na literatura a respeito da etiologia, curso clínico e prognóstico do CCE originado em jovens. Estudos com este grupo etário são escassos e não há relatos enfocando a expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas. Investigar estas questões é importante, pois se diferenças entre os grupos existirem, estratégias de tratamento para pacientes jovens podem ser diferentes dos mais idosos.

O desenvolvimento de biomarcadores moleculares é clinicamente importante, pois pode ajudar a identificar, prever a recorrência e a progressão de tumores e, tornar os tratamentos mais eficazes (Wang et al., 2013).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Carcinoma de células escamosas de boca**

O CCE de boca se origina no epitélio de revestimento, sendo considerada a neoplasia maligna mais comum nesta região (Lira et al., 2009). Afeta principalmente homens entre a 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> décadas de vida, sendo relativamente raro em pacientes jovens ( $\leq 40$  anos) (Llewellyn et al., 2001, 2003; Johnson et al., 2005; Sasaki et al., 2005).

O CCE de boca está associado ao uso de tabaco e álcool (Johnson et al., 2005). Em jovens sua etiologia parece ser distinta do CCE de boca em pacientes acima de 50 anos de idade, devido à exposição menos significativa a estes fatores de risco, sugerindo que o CCE de boca neste grupo pode ser geneticamente diferente dos mais idosos (Llewellyn et al., 2001; Tremblay et al., 2006; Kaminagakura et al., 2011; Bodner et al., 2014).

Nos últimos anos, o CCE de boca tem aumentado em jovens, especialmente no sexo feminino e em pacientes que nunca consumiram álcool ou tabaco (Chitapanarux et al., 2006). Outros estudos também apontaram que sua incidência está aumentando neste grupo etário em diversos países (Myers et al., 2000; Pitman et al., 2000; Davidson et al., 2001; Hyam et al., 2003; Manuel et al., 2003; Sasaki et al., 2005; Kaminagakura et al., 2010; Lira et al., 2009) ressaltaram a necessidade de uma atenção especial para o aumento do número de casos de CCE em jovens e que não se expõem ao fumo e ao álcool.

Muitos fatores podem influenciar o prognóstico de pacientes com CCE. Os mais importantes incluem o tipo e a localização

do tumor, estágio da doença e modo de invasão (Polanska et al., 2014). Fatores como recursos biológicos e genéticos das células neoplásicas malignas, idade do paciente, a condição geral de saúde e a resposta ao tratamento também podem afetar o prognóstico dos pacientes (Polanska et al., 2014).

O momento do diagnóstico é de grande importância para um bom prognóstico. Mas o CCE de boca em pacientes jovens parece, com frequência, ser diagnosticado em estágios avançados, o que compromete muito o tratamento, qualidade de vida e a sobrevivência (Ribeiro et al., 2009; Kaminagakura et al., 2010).

Discordâncias em relação ao prognóstico dos pacientes jovens com CCE de boca são abundantes. Em 1992, Kuriakose et al. sugeriram que neste grupo o curso clínico era mais agressivo do que nos mais idosos. Recentemente, autores reportaram que o prognóstico é similar entre os grupos avaliados (Myers et al., 2000; Pitman et al., 2000; Manuel et al., 2003; Sasaki et al., 2005; Kaminagakura et al., 2010).

Sugere-se que vários fatores podem estar relacionados, em maior ou menor grau, ao comportamento clínico do CCE de boca em pacientes jovens. Entre eles, estão uma possível suscetibilidade genética para tumores, aumento da instabilidade genômica, infecção por papilomavírus humano (HPV) (Kaminagakura et al., 2012), e abordagens terapêuticas inadequadas, como procedimentos cirúrgicos conservadores (Chitapanarux et al., 2006; Warnakulasuriya et al., 2007).

A infecção por HPV, como os tipos 16 e 18 de alto risco, tem sido amplamente divulgado como um mecanismo importante por trás do desenvolvimento de CCE de orofaringe. No entanto, o papel do HPV no desenvolvimento do CCE oral ainda é uma questão de debate, especialmente em pacientes jovens (Toner, O'Regan, 2009; Kaminagakura et al., 2012; Polanska et al., 2014). Outros autores levantaram a possibilidade da etiologia viral contribuir para o desenvolvimento de CCE em pacientes não fumantes (Durr et al., 2013).

Em 2003, Hyam et al. compararam as características clínicas e histopatológicas de CCE de língua em três grupos: pacientes abaixo de 40, entre 40-60 e acima de 60 anos. A sobrevida global foi menor nos pacientes acima de 60 anos apesar da maioria dos jovens apresentarem tumores de alto grau de malignidade. Este fato pode estar associado com a presença de comorbidades tais como, doenças cardíacas ou pulmonares nos pacientes mais idosos. Outros autores afirmaram que, quando o CCE de boca se desenvolve sem os fatores de risco tradicionalmente reconhecidos, a taxa de sobrevida é menor, independentemente da idade (Myers et al., 2000).

Popovtzer et al., em 2004, encontraram dois padrões distintos de comportamento nos pacientes jovens com CCE de língua: um curso agressivo, com 40% de mortalidade nos 2 primeiros anos devido à metástase regional e à distância e, um outro grupo que apresenta um curso indolente nos quais os pacientes estavam livres da doença por 20 anos. Contrário aos jovens, os pacientes mais idosos constituíram um perfil mais homogêneo, o óbito em decorrência da doença ocorreu gradualmente ao longo de 10 anos.

Em 2007, Warnakulasuriya et al. examinaram a sobrevida relativa entre pacientes jovens e idosos diagnosticados com câncer de boca e orofaringe no sudeste da Inglaterra. Relataram que como a sobrevida relativa considera também outras causas de morte, esperou-se que esta seria maior na população idosa, porém, os achados sugeriram que o câncer oral não é mais agressivo em jovens do que em pessoas mais velhas. O diagnóstico tardio e o estágio do tumor pareceu determinar o prognóstico.

Soudry et al. (2010) avaliaram as características clínico-patológicas de pacientes com menos de 30 anos de idade com CCE de língua e relataram que estes pacientes apresentaram estádios tumorais avançados e com um padrão diferente em comparação com a faixa etária acima dos 30 anos. Isto pode ser atribuído à relação da idade com o

comportamento biológico ou ao atraso no diagnóstico do tumor. Diferenças na sobrevida livre de doença e sobrevida global não foram estabelecidas entre os grupos.

Em 2012, Udeabor et al. relataram que o CCE de boca em pacientes com menos de 40 anos de idade apresentou evolução clínica e características histopatológicas semelhantes com aqueles com mais de 40 anos de idade. A sobrevida livre de doença também não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa. No entanto, a sobrevida global de 5 anos foi melhor no grupo de jovens em comparação com o grupo de pacientes acima dos 40 anos.

Os dados da sobrevida global ou sobrevida livre de doença entre fumantes e não fumantes com CCE de língua também não mostraram diferenças significativas no estudo de Durr et al. (2013). Neste mesmo estudo, não houve diferenças significativas nas características clínicas entre os grupos, mas foi observado um acometimento maior do sexo feminino entre os não fumantes. Relataram ainda que os pacientes que nunca fumaram parecem ter alterações moleculares que os diferem de fumantes. As mutações na *TP53*, por exemplo, são mais comuns em fumantes podendo levar a diferenças também no comportamento do tumor, porém os resultados clínicos não relacionados ao tabaco ainda é desconhecido.

## **2.2 Carcinógenos**

### **2.2.1 Tabaco**

É amplamente conhecido que o tabaco é um fator de risco do CCE e está intimamente relacionado com a intensidade e duração

deste hábito. Os cigarros contêm substâncias carcinogênicas, como as nitrosaminas e os hidrocarbonetos policíclicos (Hashibe et al., 2007; Brunotto et al., 2014).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos onipresentes distribuídos em alimentos defumados, no fumo do tabaco e ao ar livre urbano principalmente nas grandes cidades (Shimada, 2006). Os HAPs estão entre os mais de 60 carcinógenos presentes no cigarro (Khlifi et al., 2013).

Os benzopirenos, um típico HAP, são compostos pró-mutagênicos que estão na fumaça de cigarros e no gás emitido pelos carros (Takiguchi et al., 2010). A família do citocromo P450 (CYP) é um grupo de enzimas fundamental para a ativação metabólica de HAPs em epóxidos intermediários (Nebert, 1991). Estes compostos intermediários são convertidos em carcinógenos finais, diol-epóxidos, por meio da epóxido-hidrolase. Estas CYPs e as enzimas epóxido-hidrolases microssomais agem conjuntamente para a ativação metabólica dos benzopirenos, que por sua vez, geram um produto final que pode degradar diversas moléculas, incluindo o DNA (Kim et al., 1998).

As principais isoformas de CYP envolvidas na bioativação dos benzopirenos são os CYP1A1 e CYP1B1 (Chi et al., 2009). Estas proteínas pertencem à família 1 do citocromo P450, subfamílias A e B, respectivamente, e desempenham um papel significativo no processo de oxidação de substâncias carcinogênicas, tais como os componentes do fumo de cigarro (Brunotto et al., 2014). Estudos realizados por Ruwali et al. (2009) demonstraram que os genótipos variantes do citocromo *P450 1A1 (CYP1A1)* e *P450 1B1 (CYP1B1)* podem aumentar o risco de CCE de cabeça e pescoço.

A CYP1A1, do ponto de vista farmacológico, é um dos membros mais importantes da família CYP. Ela participa do metabolismo de um grande número de xenobióticos, além de um pequeno número de substratos endógenos (Androutsopoulos et al., 2009; Piotrowska et al.,

2013). A CYP1A1 também é responsável pelo metabolismo de vários medicamentos, componentes alimentares, e contaminantes ambientais (Piotrowska et al., 2013). Ao mesmo tempo, a hidroxilação na posição de um anel aromático é uma das principais reações catalisadas por esta enzima (Androutsopoulos et al., 2009; Piotrowska et al., 2013), e tem sido considerada um marco para o início da carcinogênese, através da formação de produtos altamente reativos que podem causar mutações oncogênicas em animais experimentais e seres humanos (Androutsopoulos et al., 2009).

Sugere-se que a CYP1A1 seja uma enzima extra-hepática primária envolvida no metabolismo dos carcinógenos. Consequentemente, têm-se investigado a expressão desta enzima em tecidos extra-hepáticos, tais como o pulmão, os quais são em grande parte expostos a cancerígenos ambientais. Estes resultados adicionam-se ao papel da CYP1A1, sendo sua hiperexpressão observada em lesões potencialmente malignas e malignas, devido à contínua exposição aos agentes carcinogênicos e subsequente metabolização dos HAPs e seus subprodutos (Androutsopoulos et al., 2009).

Relatos da expressão elevada de CYP1A1 em certos tumores, como por exemplo o carcinoma de pulmão, em relação aos tecidos normais vizinhos se destacam como um mecanismo provável para a resistência do tumor a quimioterapia, através do metabolismo e eliminação rápida dos fármacos administrados (Badal, Delgoda, 2014). A administração de um inibidor desta enzima pode, potencialmente, evitar tais depleções para, em seguida, melhorar o desempenho do fármaco original na terapia contra o câncer. Esta avaliação pode dar a oportunidade de compostos naturais e sintéticos revelarem propriedades quimiopreventivas através do impacto na atividade da enzima CYP1A1 (Badal, Delgoda, 2014).

Outro membro da subfamília CYP1 é a CYP1B1. Essa enzima está envolvida no metabolismo de xenobióticos e endobióticos,

como a CYP1A1, e também participa da ativação de vários mutagênicos ambientais, como por exemplo, os HAPs, reativando metabólitos de modo semelhante ou mesmo superior a CYP1A1 (Kim et al., 1998; Piotrowska et al., 2013). A CYP1B1 pode ser detectada em uma variedade de tumores, mas não nos tecidos normais adjacentes, onde apenas o RNAm é detectado (Piotrowska et al., 2013).

Na literatura, relatos da expressão proteica da CYP1B1 em linhagem de células orais humanas são limitados e variáveis (Chi et al., 2009). A CYP1B1 pode ser um importante biomarcador da carcinogênese oral induzida pelo fumo (Chi et al., 2009). De acordo com Murray et al. (2001), nos tecidos bucais, a CYP1B1 é expressa tanto no tecido normal como em células tumorais, onde a sua expressão atinge níveis muito mais elevados em comparação com o tecido normal.

Em 2009, Chi et al. avaliaram a expressão diferencial de CYP1A1 e CYP1B1 induzida pelo benzopireno em células do CCE de boca e pelo fumo do tabaco em células da mucosa bucal. Em relação às células do CCE de boca demonstraram que houve uma maior expressão do CYP1A1 ou similar entre eles. Porém, a análise de tecido gengival em fumantes mostrou uma expressão mais acentuada de CYP1B1 em comparação a CYP1A1, independentemente da idade, sexo, etnia e uso de álcool. Em não fumantes, a expressão proteica de CYP1B1 foi baixa ou indetectável. Com isso, concluíram que houve variação individual na expressão da CYP1A1 e CYP1B1 e hiperexpressão das mesmas foram correlacionadas com o risco de desenvolvimento de CCE oral.

Em 2011, Sacks et al. utilizaram as células orais normais de vários indivíduos para investigar os efeitos das partículas de tabaco de diferentes tipos de cigarros sobre a capacidade das células em metabolizar o benzopireno e induzir a expressão de proteínas de fase I, como as do citocromo P450. Os resultados deste estudo demonstram que a exposição do tecido epitelial oral normal a partículas de tabaco aumenta a taxa de metabolismo do benzopireno em produtos tóxicos, mas somente

em baixas concentrações de partículas de tabaco. Todas as partículas de tabaco foram eficazes na indução das proteínas de fase I. A expressão destas é muitas vezes dependente da ativação de receptores de hidrocarboneto e/ou elementos de resposta antioxidante.

Pradhan et al. (2011) investigaram a expressão proteica do CYP1B1, através da técnica de Western Blot e imuno-histoquímica e verificaram que todos os casos ( $n=51$ ) de CCE de boca exibiram hipoexpressão de CYP1B1 quando comparados aos tecidos normais. Relataram ainda que não houve associação entre a expressão de CYP1B1 e o estadiamento dos tumores de CCE de boca, gênero do paciente e topografia da lesão.

Em 2012, Shukla et al. estudaram o polimorfismo genético das enzimas metabolizadoras de drogas como um fator de risco para o desenvolvimento de CCE de boca. Relataram que a CYP1A1 foi expressa em 30% dos pacientes com CCE de boca, uma incidência estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle saudável (4%), indicando que a associação entre o polimorfismo genético e a suscetibilidade ao desenvolvimento de CCE foi consistente com altos níveis de CYP1A1 presente no tecido bucal. O grupo controle incluiu pacientes atendidos no mesmo local com condições que necessitavam de tratamento odontológico, porém sem lesões bucais. Ainda nesse estudo, a frequência e a duração do consumo de tabaco foi significativamente maior no grupo com casos de carcinoma oral (62%) enquanto que no grupo controle apenas 4% consumiam tabaco por mais de 15 anos. Apesar disso, alguns autores não reportam diferenças genotípicas que poderiam alterar a expressão proteica de CYP1A1 em fumantes e não fumantes (Kato et al., 1999).

Khelifi et al. (2013) revisaram a associação entre os polimorfismos de genes que codificam enzimas de metabolismo carcinogênico: quatro enzimas do citocromo P450 (CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6 e CYP2E1) e duas isoenzimas N-acetiltransferase (NAT1 e

NAT2), e mostraram seu possível envolvimento na predisposição ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Descreveram que o risco depende de vários fatores, como o nível de exposição ao agente mutagênico e etnia. A susceptibilidade ao câncer foi diferente de acordo com o genótipo de um determinado grupo étnico. Além disso, a expressão gênica das enzimas metabolizadoras variou amplamente em diversos locais situados na região da cabeça e pescoço.

É provável que as variações individuais em atividades metabólicas tóxicas reguladoras do DNA podem ser parcialmente responsáveis pela suscetibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento do câncer relacionado à exposição aos HAPs presentes no tabaco (Cordero et al., 2010).

### 2.2.2 Álcool

Assim como o tabagismo, o etilismo é outro fator de risco para a etiopatogenia do CCE de cabeça e pescoço (Johnson et al., 2005). Na mucosa oral, o álcool age como um solvente, promovendo um aumento da exposição aos agentes carcinogênicos, permitindo a sua captação celular (Brunotto et al., 2014).

O álcool é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase que oxida etanol a acetaldeído (Johnson et al., 2005). O acetaldeído é um composto altamente tóxico e reativo, capaz de formar adutos com outras moléculas, interferindo na síntese ou no reparo do DNA, podendo causar mutações (Marichalar-Mendia et al., 2010). Evidências indicam que a ação carcinogênica local do acetaldeído desempenha um papel importante no aumento do risco de CCE de boca associado ao consumo de álcool (Tsai et al., 2014).

A oxidação de acetaldeído a acetato é catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), principalmente a ALDH1 e ALDH2 (Boffetta, Hashibe, 2006; Visus et al., 2007). Consequentemente, a diminuição da atividade destas enzimas nos tecidos pode contribuir para níveis elevados de acetaldeído, aumentando o risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (Visus et al., 2007).

De acordo com Hwang et al. (2012), o gene *ALDH1* é regulado através de um mecanismo que envolve o ácido fólico, encontrado em altas concentrações no fígado, estômago e células da cavidade oral. Se a disponibilidade de ALDH1 aumenta, mais acetaldeído é convertido em acetato, o que diminui o efeito negativo deste acetaldeído sobre o metabolismo do ácido fólico, juntamente com seus efeitos carcinogênicos. O ácido fólico pode ainda ter efeito no ciclo celular sobre a modulação da expressão de genes e vias de transdução de sinal, com implicações no desenvolvimento do câncer. Evidências sugerem que o ácido fólico pode diminuir o risco de câncer de boca mesmo com alto consumo de álcool (Hwang et al., 2012).

Estudos apontam que a ALDH1 pode ser utilizada como um marcador de células tronco tumorais. Esta enzima protege as células tronco neoplásicas do insulto oxidativo conferindo longevidade às mesmas (Ginestier et al., 2007; Yoshioka et al., 2011; Muzio et al., 2012). A falta de eficácia da quimioterapia observada em alguns tipos de câncer também pode ser devida à presença de células tronco com um elevado conteúdo de ALDH, o que contribui para a resistência às drogas, inibindo os efeitos benéficos da quimioterapia (Muzio et al., 2012).

Michifuri et al. (2012) estudaram a expressão proteica de ALDH1 em CCE de boca e em epitélio oral normal, e relataram que não foi observada expressão em células do epitélio oral normal. Porém, houve alta expressão de ALDH1 no citoplasma de células tumorais, sendo que a maior expressão foi correlacionada com tumores indiferenciados e a presença de metástase linfonodal.

Em 2013, Qian et al. avaliaram a expressão proteica de ALDH1 em tumores primários e metástases de CCE de orofaringe e relataram que a expressão de ALDH1 foi detectada em 87,5% dos tumores primários e em 90% das metástases. A positividade de ALDH1 teve correlação estatisticamente significativa com tumores indiferenciados e com o prognóstico dos pacientes: a maior expressão de ALDH1 foi significativamente associada a tumores indiferenciados e à ocorrência de metástases linfonodais; e pacientes que apresentaram hipoexpressão de ALDH1 nos tumores primários tiveram uma taxa de sobrevida de 5 anos melhor do que aqueles com hiperexpressão. Além disso, Luo et al., em 2012, relataram que nos carcinomas de nasofaringe, a hiperexpressão citoplasmática de ALDH1 foi correlacionada com tumores de estádios clínicos avançados, embolização linfática e vascular, e também com a presença de metástase linfonodal.

Qian et al. (2014) relataram que pacientes com CCE de cabeça e pescoço que apresentaram hiperexpressão de ALDH1A1 foram correlacionados com tumores pobremente diferenciados e com metástases linfáticas, e tiveram uma menor sobrevida global. A hiperexpressão de ALDH1A1 foi independente da presença de HPV, uso do tabaco ou consumo de álcool.

A hiperexpressão proteica de ALDH1 também está diretamente associada à agressividade de outras neoplasias malignas, especialmente em carcinoma de mama e melanoma (Boonyaratanakornkit et al., 2010; Luo et al., 2012; Michifuri et al., 2012). No entanto, no estudo de Gong et al. (2014), com carcinomas de mama, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão da ALDH1 e o prognóstico dos pacientes, ou entre as variáveis clínico-patológicas.

Yao et al. (2011) observaram uma hiperexpressão proteica de ALDH1 em 23 dos 89 casos estudados de carcinomas cervicais de colo de útero, e em 4 dos 20 casos de adenocarcinomas. A ALDH1 não foi expressa no epitélio cervical normal. Houve correlação

entre a expressão de ALDH1 e a presença de metástases linfonodais nos carcinomas cervicais. Os pacientes que apresentaram recidiva da doença foram os mais propensos à hiperexpressão de ALDH1.

Wang et al., em 2013, demonstraram em seu estudo com carcinoma de células renais que a hiperexpressão de ALDH1A1 foi correlacionada com o estágio avançado do tumor. Além disso, os pacientes com elevada expressão de ALDH1A1 em seus tumores tiveram maior recorrência e menor taxa de sobrevida em comparação com pacientes com baixa expressão de ALDH1A1. O aumento da expressão de ALDH1A1 foi um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença nos pacientes.

Em 2005, Morita et al. estudaram a expressão proteica da ALDH2 no epitélio esofágico normal e o consumo de álcool em pacientes com carcinoma de esôfago. A hiperexpressão de ALDH2 foi observada no epitélio normal de 43 pacientes (84%), principalmente no citoplasma das células epiteliais da camada basal. A expressão da ALDH2 foi correlacionada com a quantidade de bebida alcoólica ingerida. Estes resultados sugeriram que a exposição ao álcool pode induzir a expressão epitelial de ALDH2.

Crous-Bou et al. (2013) avaliou a associação entre polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do álcool, em especial *ADH1B* e *ALDH2*, e o principal efeito do consumo de álcool no risco de desenvolvimento do câncer colorretal. Os resultados sugeriram que o polimorfismo do *ADH1B* mediado pelo alto consumo de álcool foi considerado diretamente associado ao risco de câncer colorretal, mas tal associação para polimorfismo do *ALDH2* não foi encontrada. Em complementação, os resultados da meta-análise realizada por Zhao et al. (2014) sugeriram que o polimorfismo do *ALDH2* pode estar associado com um risco reduzido de câncer colorretal.

Wang et al. (2014) realizaram uma meta-análise para determinar se polimorfismos genéticos do *ADH1*, *ADH2* e do *ALDH2*

contribuem para a patogênese do câncer gástrico. Os resultados sugeriram que o polimorfismo de *ALDH2* pode estar fortemente correlacionado com um risco aumentado de deste tipo de câncer. Além disso, observaram-se associações significativas entre polimorfismos genéticos de *ADH1* e o risco aumentado de câncer gástrico, mas não para o *ADH2*. Descreveram ainda que a mutação genética do *ALDH2* pode diminuir a sua atividade enzimática, sugerindo ser um fator protetor importante contra o alcoolismo, por eliminar a maior parte do acetaldeído tóxico e cancerígeno gerado durante o metabolismo do álcool.

Tsai et al. (2014) examinaram a interação entre consumo de álcool, os genes que metabolizam o álcool, e a higiene oral com o risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Os resultados indicaram que o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer pode ser modificado pela interação entre os polimorfismos genéticos do *ALDH2* e a higiene oral associado com o consumo de álcool. A produção de acetaldeído pelos micro-organismos bucais também desempenha um papel-chave no desenvolvimento do CCE de cabeça e pescoço.

Indivíduos que possuem alterações genotípicas na *ALDH2* podem codificar subunidades proteicas incapazes de metabolizar o acetaldeído, principalmente os asiáticos (Nomura et al., 2000; Matsuda et al., 2006). Embora haja diversos estudos a respeito da investigação de polimorfismos da *ALDH2*, há poucos relatos sobre a sua expressão proteica em CCE de boca e outros tumores.

Não há consenso na literatura a respeito da etiologia, curso clínico e prognóstico de CCE originado em pacientes jovens. Estudos com este grupo são escassos, principalmente enfocando a expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas. Investigar estas questões é importante, pois se as diferenças entre os grupos existirem, estratégias de tratamento para pacientes jovens também podem ser diferentes.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do estudo foi comparar a expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas envolvidas no processo de biotransformação do tabaco (CYP1A1 e CYP1B1) e do álcool (ALDH1 e ALDH2) entre os grupos teste (jovens  $\leq$  40 anos) e controle ( $\geq$  50 anos de idade), e correlacionar estes resultados com as características clinicopatológicas e com o prognóstico dos pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Parecer n°. 208.406 (Anexo A), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo, Código de Ética n°. 1932/14. Recebeu auxílio-pesquisa FAPESP sob n°. 2012/21660-6.

### **4.1 Análise clínicopatológica**

Os prontuários médicos de 300 pacientes com o diagnóstico de carcinoma epidermoide primário de boca tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo de São Paulo, no período de 1970 a 2007, foram retrospectivamente revisados. Os dados coletados incluíram: idade, gênero, história de lesão pré-maligna, comorbidades, fatores de risco (tabaco e álcool), histopatologia, localização, estágio TNM (UICC), de acordo com Greene et al. (2002), modalidade de tratamento e seguimento (60 meses, no mínimo).

Foram excluídos do estudo os pacientes com o diagnóstico de carcinoma epidermoide de lábio, faringe, laringe, e que os blocos de parafina não estavam disponíveis.

Os pacientes foram divididos em dois grupos:

- a) grupo teste: 41 pacientes com idade  $\leq$  40 anos;

- b) grupo controle: 59 pacientes com idade  $\geq$  50 anos.

Os espécimes biopsiados antes do tratamento ou peças cirúrgicas de pacientes que não tenham recebido tratamento prévio foram graduados de acordo com o grau de diferenciação (Johnson et al., 2005). O grau de queratinização, número de mitoses, modo de invasão, profundidade da invasão e infiltrado linfoplasmocitário também foram analisados, de acordo com Anneroth et al. (1997) e Bryne et al. (1992).

As modalidades de tratamento investigadas foram: cirurgia, radioterapia e quimioterapia indicada de forma isolada ou associada. Os casos foram avaliados quanto à recorrência local, metástase regional e à distância. A presença de segundo e múltiplo tumor primário foi baseada nos critérios propostos por Warren e Gates (1932).

#### **4.2 Construção do *Tissue microarray* (TMA)**

Após a revisão morfológica de todos os casos encontrados, foram identificadas e demarcadas áreas tumorais representativas de pelo menos um bloco original de cada caso. Cilindros de tecido (cores) dos blocos de parafina originais (doadores) foram retirados com agulhas especiais de 1 mm de diâmetro e inseridos, de forma ordenada, em um bloco receptor de resina sintética (Histosec®, Merck), utilizando um equipamento manual ou *arrayer* (Beecher Instrumedics, Microarray Technology). Cortes de 4 $\mu$ m foram realizados a partir do bloco TMA, recolhidos com o auxílio de filme aderente comercial (Instrumedics) e montados sobre lâminas comerciais com adesivo (Starfrost®, Instrumedics) e/ou carregadas positivamente (Superfrost Plus®, Erviegas). O tecido foi fixado através da exposição das lâminas à

luz ultra-violeta por 15 minutos e o adesivo plástico foi removido com solvente não clorado (TPC@, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e armazenadas a -20 °C.

### **4.3 Avaliação preliminar**

Visando avaliar a representatividade de tecido tumoral nos diferentes níveis do bloco TMA, seções seriadas correspondentes a cinco níveis de profundidade (níveis 1, 10, 20, 40, 60 µm) foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas ao microscópio de luz. Assim, foram selecionadas lâminas do bloco TMA representativas de dois diferentes níveis, a área mais indiferenciada e a área mais profunda da invasão, e submetidas a reações de imuno-histoquímica com anticorpos anti-CYP1A1, anti-CYP1B1, anti-ALDH1 e anti-ALDH2.

### **4.4 Imuno-histoquímica**

Os cortes foram pré-aquecidos a 60 °C por pelo menos 12 horas, desparafinizados em xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool. Para cada anticorpo, as lâminas foram submetidas ao método de recuperação antigênica com solução tampão de citrato (pH 6.0) através da panela de pressão Pascal (DakoCytomation, Modelo S2800). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio 3% (Merck) por 20 minutos de tratamento a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 1) previamente diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica

(NaN<sub>3</sub>) 0,1%, por 18 horas (overnight) a 4 °C em câmara úmida. A detecção da reação foi feita com o sistema comercial estreptoavidina biotina-peroxidase de acordo com as especificações do fabricante (LSAB ou StrepABC Duet, DakoCytomation), utilizando o substrato cromogênico DAB (diaminobenzidina, DakoCytomation). Por fim, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Finalmente, procedeu-se a desidratação em série de alcoóis, passagem em xilol e montagem de lâminas com Vectamount H-5000 (Vector, Peterborough, UK). Controles positivos e negativos (ausência do anticorpo primário) foram realizados nas reações imuno-histoquímicas.

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários

Anticorpo*	Clone	Diluição	Controle positivo
Anti-CYP1A1	6G5	1:75	Carcinoma de ovário
Anti-CYP1B1	Policlonal	1:600	Cérebro
Anti-ALDH1	EP1933Y	1:400	Fígado
Anti-ALDH2	EPR4493	1:200	Cólon

\*Fabricante: Abcam, Cambridge, MA, EUA.

## 4.5 Análise dos resultados

### 4.5.1 Análise imuno-histoquímica

Foi observada a marcação citoplasmática para todos os anticorpos. Os cortes nas lâminas foram escaneados, a imunopositividade foi previamente determinada e as áreas analisadas foram demarcadas (Figura 1) para que células não tumorais não fossem contadas.

Para o escaneamento das lâminas foi utilizado o aparelho ScanScope® GL System (Aperio Technologies, Inc., California, USA). As imagens digitalizadas foram analisadas através do software Aperio ImageScope Viewer®, utilizando-se o algoritmo Positive Pixel Count v9. A porcentagem de marcação positiva para cada marcador, representada pela razão de marcação positiva e marcação total (positiva e negativa) foi considerada para análise estatística.

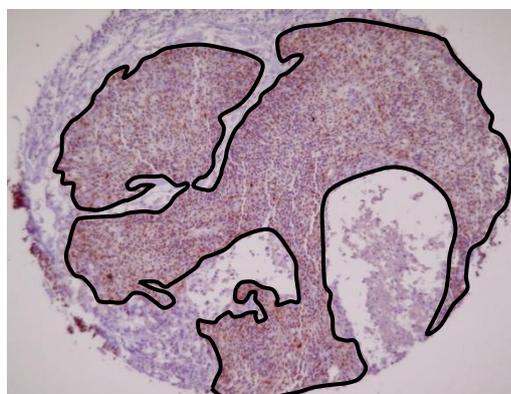


Figura 1 - Fotomicrografia exibindo área tumoral demarcada para contagem das células positivas. Imunoperoxidase, 100x.

#### 4.5.2 Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-Quadrado para verificar a homogeneidade dos grupos quanto as variáveis clínicas e anatomopatológicas.

A expressão dos marcadores CYP1A1, CYP1B1, ALDH1 e ALDH2 foi comparada entre os grupos por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Nas análises de sobrevida, as expressões dos marcadores foram dicotomizadas de acordo com a mediana. Gráficos de

Kaplan-Meier foram construídos e o teste de logrank foi utilizado para comparar os riscos de óbito por qualquer causa (sobrevida global), óbito por câncer (sobrevida doença específica) e recidiva (sobrevida livre de doença) do grupo que expressou um determinado marcador ( $\geq$ mediana) com o grupo que não expressou um determinado marcador ( $<$ mediana).

O nível de confiança adotado foi o de 5% e software livre R versão 3.0.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) foi utilizado nas análises.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise clinicopatológica

Os resultados clinicopatológicos estão resumidos na Tabela 2.

Os dados coletados através da análise dos prontuários dos pacientes revelaram que houve uma predominância do gênero masculino tanto no grupo teste (pacientes  $\leq 40$  anos de idade), como no grupo controle (pacientes  $\geq 50$  anos), representando 66% e 80% dos casos, respectivamente. Foi notada também uma predominância da raça leucoderma, representando 78% dos casos no grupo teste e 83% dos casos no grupo controle. A localização mais comum do tumor foi na língua, 50% no grupo teste e 56% no grupo controle. A maioria dos pacientes era tabagista, 79% dos casos no grupo teste e 83% dos casos no grupo controle, e também etilistas, 62% no grupo teste e 61% no grupo controle.

Em relação ao estágio TNM foi observado que o estágio T4 foi maioria entre os jovens (44%) enquanto que no grupo controle o estágio T2 (tumor de 2 cm a 4 cm em sua maior dimensão) foi predominante (39%). Quando se refere à presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais (N) observou-se que na maioria houve presença de metástase em linfonodos, 56% no grupo teste e 58% no grupo controle. Quanto ao estadiamento clínico observamos que 80% dos jovens e 78% dos mais idosos apresentaram tumores em estágio avançado (EC3 e EC4), porém a maioria dos tumores apresentou-se histologicamente bem diferenciado (63% em jovens e 57% nos mais

idosos). Esses tumores apresentaram-se com margem livre de lesão em 82% dos casos no grupo teste e em todos os casos no grupo controle, e receberam, em sua maioria, tratamento primário cirúrgico e radioterápico (56% no grupo teste e 41% no grupo controle). Apresentaram recidiva da lesão 59% dos jovens e 44% dos mais idosos, sendo que a recorrência foi local em sua maioria (33% e 25%, respectivamente). Não apresentaram um segundo tumor primário 85% e 89% dos casos, jovens e idosos, respectivamente.

Tabela 2 – Análise descritiva dos dados clínicopatológicos

*(continua)*

Variável	Categoria	Idade		Total	p
		≤40	≥50		
Gênero	Masculino	27 (66)	47 (80)	74	0,1216
	Feminino	14 (34)	12 (20)	26	
Raça	Leucoderma	32 (78)	49 (83)	81	0,5306
	Outras	9 (22)	10 (17)	19	
Localização do tumor	língua	18 (50)	30 (56)	48	0,7644
	Assoalho	12 (33)	13 (24)	25	
	Retromolar	5 (14)	10 (19)	15	
	Mucosa jugal, Palato, Rebordo, Gengiva	1 (3)	1 (2)	2	
Tabagista	Não	8 (21)	9 (17)	17	0,6358
	Sim	31 (79)	45 (83)	76	
Etilista	Não	15 (38)	21 (39)	36	0,9667
	Sim	24 (62)	33 (61)	57	
T	1	3 (7)	2 (3)	5	0,2555
	2	10 (24)	23 (39)	33	
	3	10 (24)	17 (29)	27	
	4	18 (44)	17 (29)	35	

Tabela 2 – Análise descritiva dos dados clinicopatológicos

Variável	Categoria	Idade		Total	p
		≤40	≥50		
N	0	18 (44)	25 (42)	43	0,8792
	Demais	23 (56)	34 (58)	57	
M	Presença	0 (0)	0 (0)	0	<b>NA<sup>‡</sup></b>
	Ausência	41 (100)	59 (100)	99	
Estádio clínico	Precoce (1-2)	8 (20)	13 (22)	21	0,7607
	Avançado (3-4)	33 (80)	46 (78)	79	
Histopatológico	Bem	26 (63)	30 (57)	56	<b>0,0246</b>
	Moderadamente	7 (17)	20 (38)	27	
	Pobrementemente	8 (20)	3 (6)	11	
Margem da lesão	Livre	32 (82)	35 (100)	67	<b>0,0253</b>
	Comprometida	7 (18)	0 (0)	7	
Tratamento primário*	C	15 (37)	22 (38)	37	0,1591
	RxT	1 (2)	9 (16)	10	
	C+RxT	23 (56)	24 (41)	47	
	C+RxT+QT	2 (5)	3 (5)	5	
Recidiva	Não	16 (41)	20 (56)	36	0,2083
	Sim	23 (59)	16 (44)	39	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; <sup>‡</sup>NA não se aplica

## 5.2 Análise imuno-histoquímica

### 5.2.1 Análise descritiva da marcação e comparativa entre os grupos

As marcações imuno-histoquímicas foram observadas no citoplasma das células neoplásicas, caracterizadas por uma coloração acastanhada e homogênea, como exemplificada na Figura 2.

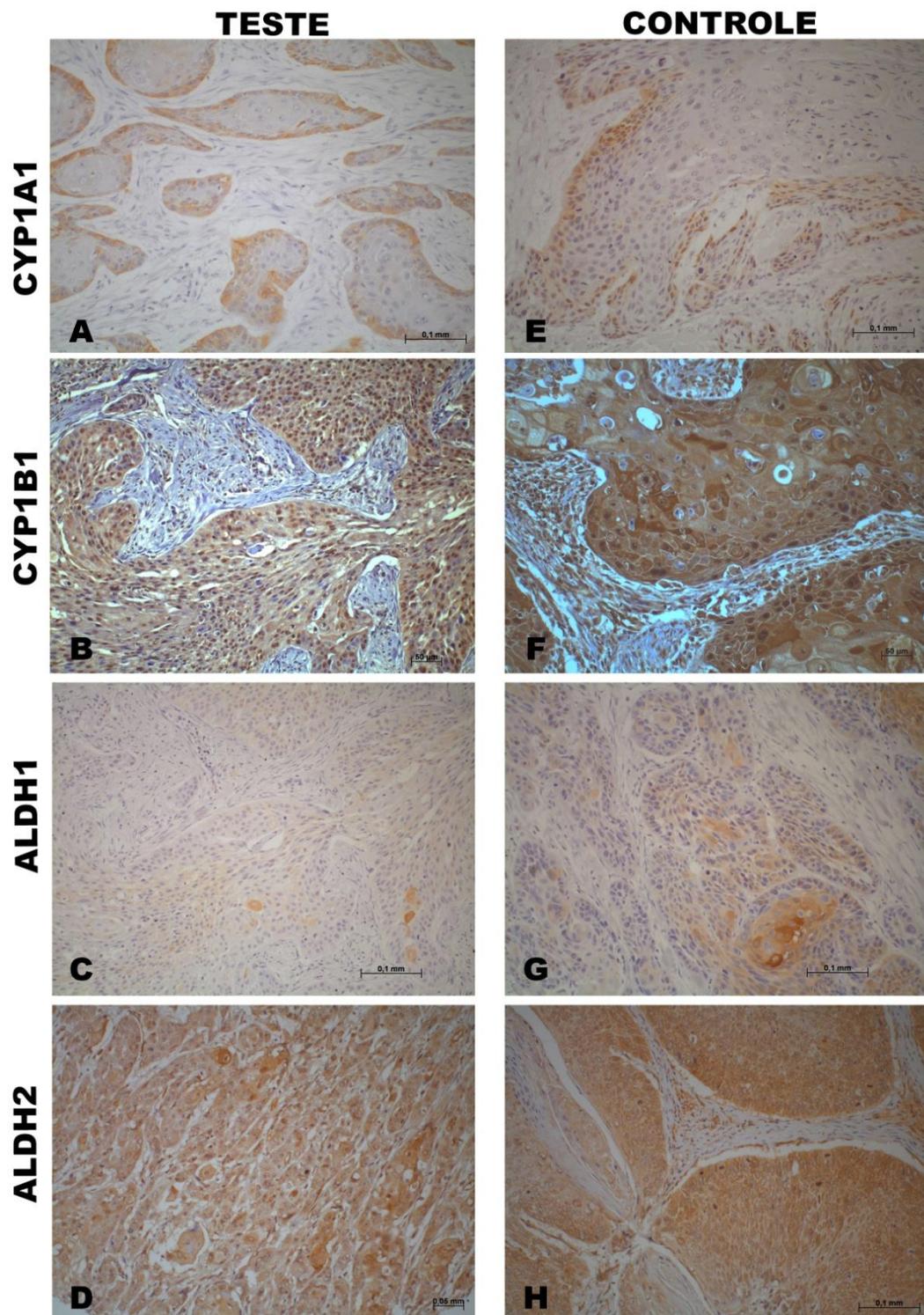


Figura 2 – Imunomarcaco nos grupos estudados. Grupo teste: A) CYP1A1; B) CYP1B1; C) ALDH1; D) ALDH2. Grupo controle: E) CYP1A1; F) CYP1B1; G) ALDH1; H) ALDH2. Aumento 200x, Coloraco DAB.

Os resultados das análises imuno-histoquímicas obtidos nos espécimes nos grupos avaliados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise comparativa entre grupos para as proteínas estudadas

Marcador	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
CYP1A1	Teste	41	0,098	0,146	0,036	0,312
	Controle	59	0,160	0,208	0,054	
CYP1B1	Teste	41	0,990	0,012	0,993	<b>&lt;0.001</b>
	Controle	59	0,997	0,002	0,997	
ALDH1	Teste	41	0,036	0,101	0,006	0,109
	Controle	59	0,125	0,220	0,008	
ALDH2	Teste	41	0,867	0,121	0,585	0,130
	Controle	59	0,894	0,119	0,462	

De acordo com a Tabela 3, o teste demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão dos marcadores ALDH1, ALDH2 e CYP1A1 quando se comparam os grupos ( $p > 0,05$ ). Houve diferença estatística entre os grupos para a proteína CYP1B1 ( $p < 0,001$ ), onde a expressão desta foi maior nos pacientes mais idosos (controle). Isso também pode ser observado nos gráficos das Figuras 3 a 6.

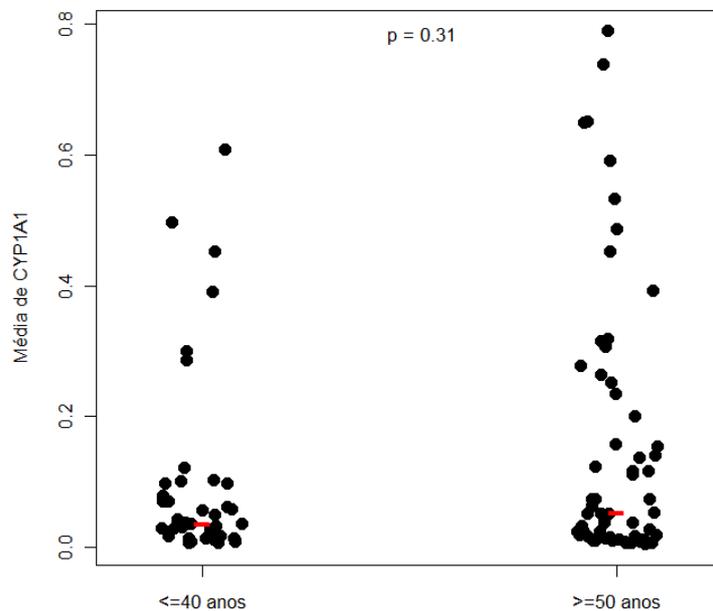


Figura 3 – Gráfico representativo do marcador CYP1A1 para cada grupo.

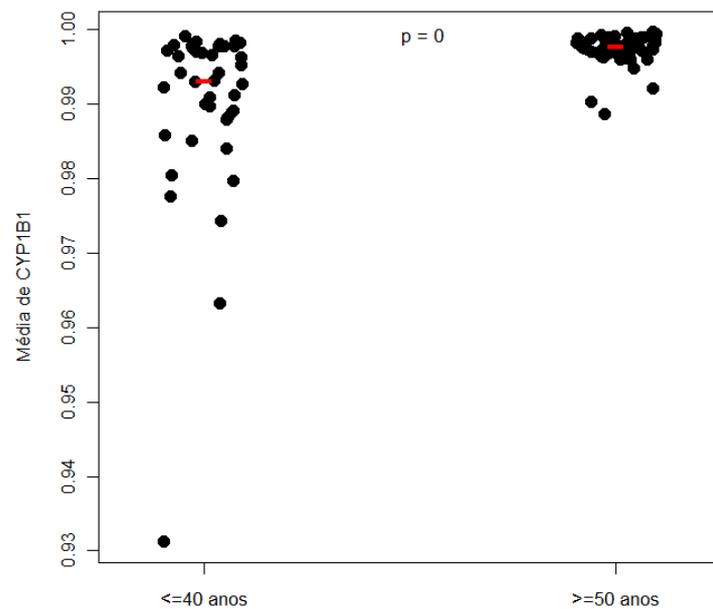


Figura 4 – Gráfico representativo do marcador CYP1B1 para cada grupo.

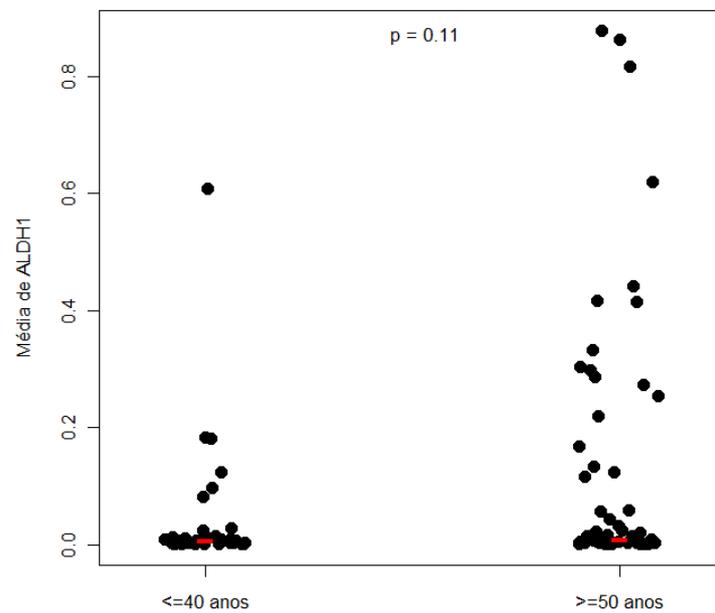


Figura 5 – Gráfico representativo do marcador ALDH1 para cada grupo.

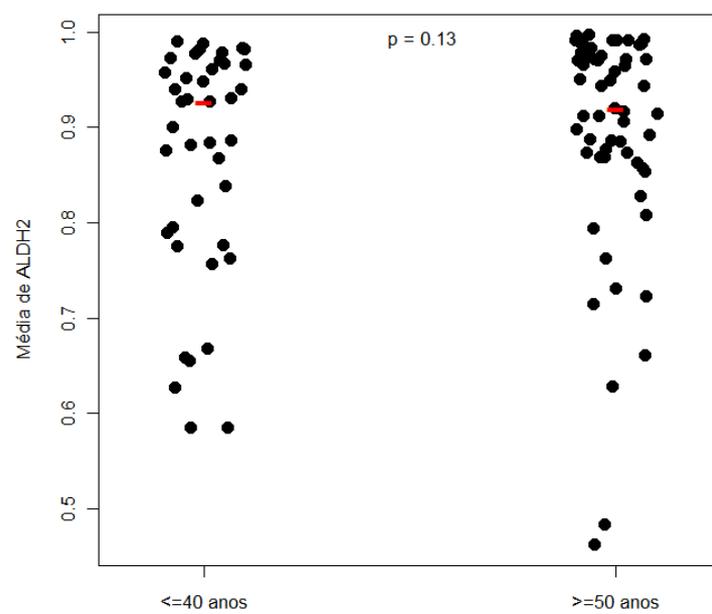


Figura 6 – Gráfico representativo do marcador ALDH2 para cada grupo.

### 5.2.2 Correlação entre os marcadores imuno-histoquímicos

Todas as possíveis correlações entre os marcadores, duas a duas, considerando todos os pacientes e considerando os pacientes do grupo teste (jovens) e grupo controle (adultos) separados, estão exemplificadas no Apêndice A. De acordo com os valores de  $p$  observados houve algumas correlações estatisticamente significantes, porém os valores de correlação ( $r$ ) não foram significativos.

### 5.2.3 Análise comparativa entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão imuno-histoquímica

Podemos observar o resultado estatístico comparativo entre as variáveis clinicopatológicas e os marcadores imuno-histoquímicos (CYP1A1, CYP1B1, ALDH1 e ALDH2), sem distinção por grupo, nas Tabelas 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

A expressão da CYP1A1 associou-se significativamente com as variáveis: gênero, tabagismo e etilismo ( $p < 0,05$ ), sendo que a sua maior expressão foi observada no gênero masculino, em pacientes tabagistas e etilistas (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1A1

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	74	0,155	0,194	0,061	<b>0,007</b>
	Feminino	26	0,077	0,153	0,021	
Local do Tumor	Língua	48	0,118	0,185	0,038	0,584
	Assoalho	25	0,163	0,178	0,097	
	Retromolar	15	0,171	0,245	0,050	
	Mucosa jugal, palato rebordo e gengiva	2	0,155	0,205	0,155	
Tabagista	Não	17	0,036	0,033	0,024	<b>0,019</b>
	Sim	76	0,154	0,196	0,060	
Etilista	Não	36	0,098	0,179	0,028	<b>0,01</b>
	Sim	57	0,155	0,184	0,070	
T	1+2	38	0,093	0,118	0,040	0,46
	3+4	62	0,160	0,215	0,052	
N	0	43	0,110	0,171	0,035	0,17
	Demais	57	0,153	0,197	0,054	
Estadio clínico	Precoce	21	0,066	0,106	0,027	0,09
	Avançado	79	0,152	0,199	0,052	
Histopatológico	Bom	56	0,107	0,151	0,044	0,71
	Moderado	27	0,147	0,203	0,051	
	Pobre	11	0,096	0,148	0,029	
Margem	Livre	67	0,092	0,135	0,038	0,48
	Comprometida	7	0,065	0,104	0,029	
Recidiva	Não	36	0,088	0,117	0,034	0,62
	Sim	39	0,099	0,152	0,037	
Raça	Branca	81	0,131	0,182	0,038	0,43
	Não Branca	19	0,150	0,208	0,052	
Tratamento primário*	C	37	0,085	0,107	0,103	0,06
	RxT	10	0,285	0,271	0,463	
	C+RxT	47	0,117	0,172	0,130	
	C+RxT+QT	5	0,320	0,347	0,591	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia.

Na Tabela 5 observamos que a expressão da CYP1B1 associou-se significativamente com as variáveis: T (extensão do tumor primário), estágio clínico e comprometimento de margens cirúrgicas ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores T1 e T2, em estágio clínico precoce e com margens cirúrgicas livres de neoplasia.

Tabela 5 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1B1

*(continua)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	74	0,994	0,009	0,997	0,83
	Feminino	26	0,995	0,004	0,997	
Local do Tumor	Língua	48	0,995	0,006	0,997	0,80
	Assoalho	25	0,992	0,014	0,997	
	Retromolar	15	0,995	0,006	0,997	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	2	0,995	0,004	0,995	
Tabagista	Não	17	0,996	0,003	0,997	0,16
	Sim	76	0,993	0,009	0,997	
Etilista	Não	36	0,996	0,004	0,997	0,14
	Sim	57	0,993	0,010	0,997	
T	1+2	38	0,995	0,011	0,997	<b>0,0014</b>
	3+4	62	0,993	0,006	0,996	
N	0	43	0,993	0,011	0,997	0,46
	Demais	57	0,994	0,005	0,997	
Estádio clínico	Precoce	21	0,994	0,014	0,998	<b>0,01</b>
	Avançado	79	0,994	0,006	0,997	
Histopatológico	Bom	56	0,994	0,006	0,997	0,39
	Moderado	27	0,993	0,013	0,997	
	Pobre	11	0,994	0,006	0,997	
Margem	Livre	67	0,993	0,010	0,997	<b>0,02</b>
	Comprometida	7	0,990	0,006	0,992	

Tabela 5 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1B1

*(conclusão)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Recidiva	Não	36	0,990	0,005	0,997	0,07
	Sim	39	0,991	0,012	0,996	
Raça	Branca	81	0,994	0,006	0,997	0,75
	Não Branca	19	0,992	0,015	0,997	
Tratamento primário*	C	37	0,995	0,006	0,998	0,68
	RxT	10	0,996	0,004	0,998	
	C+RxT	47	0,993	0,010	0,998	
	C+RxT+QT	5	0,996	0,003	0,999	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia.

Na Tabela 6 demonstra que a expressão da ALDH1 associou-se significativamente com as variáveis: recidiva da lesão e tratamento primário ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada na ausência de recidiva da lesão e na realização de tratamento primário cirúrgico.

Tabela 6 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH1

*(continua)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	74	0,088	0,169	0,008	0,469
	Feminino	26	0,089	0,229	0,005	
Local do Tumor	Língua	48	0,066	0,153	0,006	0,541
	Assoalho	25	0,126	0,243	0,006	
	Retromolar	15	0,106	0,188	0,013	
	Mucosa jugal, Palato, Rebordo, Gengiva	2	0,003	0,004	0,003	

Tabela 6 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH1

*(conclusão)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Tabagista	Não	17	0,012	0,028	0,004	0,15
	Sim	76	0,092	0,179	0,007	
Etilista	Não	36	0,063	0,195	0,004	0,11
	Sim	57	0,086	0,143	0,007	
T	1+2	38	0,122	0,231	0,006	0,74
	3+4	62	0,068	0,150	0,007	
N	0	43	0,116	0,203	0,011	0,13
	Demais	57	0,067	0,170	0,006	
Estádio clínico	Precoce	21	0,134	0,239	0,01	0,65
	Avançado	79	0,076	0,169	0,007	
Histopatológico	Bom	56	0,037	0,075	0,006	0,10
	Moderado	27	0,173	0,261	0,019	
	Pobre	11	0,108	0,256	0,006	
Margem	Livre	67	0,075	0,157	0,007	0,15
	Comprometida	7	0,005	0,005	0,003	
Recidiva	Não	36	0,083	0,147	0,010	<b>0,02</b>
	Sim	39	0,053	0,154	0,004	
Raça	Branca	81	0,089	0,181	0,007	0,79
	Não branca	19	0,086	0,208	0,008	
Tratamento primário*	C	37	0,105	0,179	0,180	<b>0,04</b>
	RxT	10	0,143	0,249	0,121	
	C+RxT	47	0,050	0,142	0,018	
	C+RxT+QT	5	0,065	0,130	0,024	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia.

A expressão da ALDH2 associou-se significativamente com as variáveis: localização do tumor, tabagismo e etilismo ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores localizados no assoalho bucal, nos pacientes tabagistas e etilistas (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH2

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	74	0,894	0,106	0,923	0,314
	Feminino	26	0,853	0,150	0,919	
Local do Tumor	Língua	48	0,852	0,127	0,886	<b>0,010</b>
	Assoalho	25	0,938	0,062	0,970	
	Retromolar	15	0,906	0,142	0,967	
	Mucosa Jugal, palato, rebordo e gengiva	2	0,935	0,060	0,935	
Tabagista	Não	17	0,822	0,137	0,885	<b>0,010</b>
	Sim	76	0,894	0,113	0,930	
Etilista	Não	36	0,837	0,142	0,886	<b>0,016</b>
	Sim	57	0,909	0,096	0,940	
T	1+2	38	0,884	0,121	0,923	0,884
	3+4	62	0,883	0,120	0,921	
N	0	43	0,888	0,118	0,94	0,719
	Demais	57	0,879	0,122	0,900	
Estádio clínico	Precoce	21	0,892	0,122	0,948	0,815
	Avançado	79	0,881	0,120	0,916	
Histopatológico	Bom	56	0,892	0,094	0,917	0,954
	Moderado	27	0,854	0,158	0,898	
	Pobre	11	0,860	0,140	0,916	
Margem	Livre	67	0,856	0,131	0,892	0,644
	Comprometida	7	0,904	0,070	0,929	
Recidiva	Não	36	0,864	0,123	0,889	0,940
	Sim	39	0,853	0,131	0,898	
Raça	Branca	81	0,879	0,121	0,915	0,386
	Não branca	19	0,902	0,115	0,931	
Tratamento primário*	C	37	0,880	0,111	0,966	0,062
	RxT	10	0,938	0,088	0,987	
	C+RxT	47	0,865	0,133	0,969	
	C+RxT+QT	5	0,944	0,066	0,983	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia.

Os resultados comparativos entre as variáveis clinicopatológicas e os marcadores imuno-histoquímicos: CYP1A1, CYP1B1, ALDH1 e ALDH2, considerando apenas os pacientes do grupo teste, estão expressos nas Tabelas 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

A expressão da CYP1A1 associou-se significativamente com a variável localização do tumor ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores localizados na mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva, considerando os pacientes jovens (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1A1, considerando o grupo teste

(continua)

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	27	0,119	0,168	0,050	0,221
	Feminino	14	0,057	0,077	0,030	
Raça	Branca	32	0,099	0,146	0,036	0,813
	Não branca	9	0,094	0,153	0,043	
Local do tumor	Língua	18	0,033	0,026	0,028	<b>0,011</b>
	Assoalho	12	0,191	0,213	0,084	
	Retromolar	5	0,035	0,018	0,031	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,300	NA	0,300	
Tabagista	Não	8	0,032	0,021	0,028	0,169
	Sim	31	0,119	0,162	0,056	
Etilista	Não	15	0,073	0,150	0,029	0,109
	Sim	24	0,120	0,147	0,057	
T	1+2	13	0,095	0,126	0,062	0,169
	3+4	28	0,099	0,156	0,033	
N	0	18	0,071	0,112	0,036	0,674
	Demais	23	0,119	0,167	0,043	
Estádio Clínico	Precoce	8	0,123	0,155	0,084	0,110
	Avançado	33	0,091	0,145	0,035	
Histopa-Tológico	Bom	26	0,098	0,142	0,044	0,564
	Moderado	7	0,111	0,174	0,035	
	Pobre	8	0,084	0,151	0,024	

Tabela 8 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1A1, considerando o grupo teste

*(conclusão)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Margem	Livre	32	0,097	0,149	0,040	0,420
	Comprometida	7	0,065	0,104	0,029	
Recidiva	Não	16	0,091	0,118	0,052	0,689
	Sim	23	0,108	0,169	0,035	
Tratamento primário*	C	15	0,075	0,110	0,037	0,524
	RxT	1	0,391	NA	0,391	
	C+RxT	23	0,104	0,162	0,035	
	C+RxT+QT	2	0,053	0,062	0,053	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da CYP1B1 associou-se significativamente com as variáveis: T (tamanho do tumor) e estágio clínico (EC) ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores T1+T2 e em estágio clínico precoce (EC1+EC2) (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1B1, considerando o grupo teste

*(continua)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Maculino	27	0,988	0,014	0,992	0,449
	Feminino	14	0,993	0,005	0,994	
Raça	Branca	32	0,990	0,008	0,993	0,570
	Não branca	9	0,987	0,021	0,997	
Local do tumor	Língua	18	0,991	0,008	0,995	0,908
	Assoalho	12	0,986	0,019	0,993	
	Retromolar	5	0,989	0,008	0,990	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,992	NA	0,992	
Tabagista	Não	8	0,994	0,003	0,995	0,296
	Sim	31	0,988	0,013	0,993	

Tabela 9 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1B1, considerando o grupo teste

<i>(conclusão)</i>						
Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Etilista	Não	15	0,993	0,006	0,996	0,248
	Sim	24	0,987	0,014	0,992	
T	1+2	13	0,990	0,018	0,997	<b>0,019</b>
	3+4	28	0,989	0,007	0,991	
N	0	18	0,988	0,016	0,994	0,645
	Demais	23	0,991	0,007	0,992	
Estádio clínico	Precoce	8	0,989	0,023	0,997	<b>0,043</b>
	Avançado	33	0,990	0,008	0,992	
Histopatológico	Bom	26	0,990	0,008	0,992	0,310
	Moderado	7	0,983	0,024	0,996	
	Pobre	8	0,993	0,006	0,997	
Margem	Livre	32	0,990	0,013	0,995	0,464
	Comprometida	7	0,990	0,006	0,992	
Recidiva	Não	16	0,992	0,007	0,996	0,331
	Sim	23	0,988	0,014	0,992	
Tratamento primário*	C	15	0,992	0,009	0,996	0,216
	RxT	1	0,984	NA	0,984	
	C+RxT	23	0,988	0,014	0,992	
	C+RxT+QT	2	0,994	0,006	0,994	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da ALDH1 associou-se significativamente com as variáveis: T (extensão do tumor primário), estágio clínico e recidiva da lesão ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores T1+T2, em estágio clínico precoce (EC1+EC2) e na ausência de recidiva (Tabela 10).

Tabela 10 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH1, considerando o grupo teste

*(continua)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	27	0,027	0,052	0,007	0,804
	Feminino	14	0,055	0,160	0,005	
Raça	Branca	32	0,036	0,111	0,005	0,449
	Não branca	9	0,036	0,062	0,008	
Local do tumor	Língua	18	0,037	0,061	0,009	0,437
	Assoalho	12	0,013	0,027	0,003	
	Retromolar	5	0,004	0,003	0,004	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,006	NA	0,006	
Tabagista	Não	8	0,021	0,041	0,007	0,663
	Sim	31	0,042	0,115	0,004	
Etilista	Não	15	0,007	0,008	0,003	0,094
	Sim	24	0,057	0,129	0,007	
T	1+2	13	0,088	0,168	0,013	<b>0,010</b>
	3+4	28	0,012	0,028	0,004	
N	0	18	0,060	0,145	0,007	0,4005
	Demais	23	0,018	0,041	0,006	
Estádio clínico	Precoce	8	0,113	0,208	0,012	<b>0,044</b>
	Avançado	33	0,018	0,039	0,004	
Histopatológico	Bom	26	0,026	0,051	0,007	0,204
	Moderado	7	0,110	0,223	0,008	
	Pobre	8	0,005	0,005	0,003	
Margem	Livre	32	0,045	0,113	0,007	0,133
	Comprometida	7	0,005	0,005	0,003	

Tabela 10 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH1, considerando o grupo teste

*(conclusão)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Tratamento primário*	C	15	0,075	0,159	0,010	0,142
	RxT	1	0,007	NA	0,007	
	C+RxT	23	0,016	0,030	0,006	
	C+RxT+QT	2	0,001	0,000	0,001	
Recidiva	Não	16	0,068	0,152	0,012	<b>0,041</b>
	Sim	23	0,017	0,043	0,004	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da ALDH2 associou-se significativamente com as variáveis: localização do tumor e gradação histopatológica ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores localizados na mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva, e bem diferenciados (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH2, considerando o grupo teste

*(continua)*

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	27	0,887	0,092	0,900	0,425
	Feminino	14	0,828	0,161	0,933	
Raça	Branca	32	0,858	0,120	0,885	0,213
	Não branca	9	0,900	0,128	0,931	
Local Do tumor	Língua	18	0,801	0,134	0,809	<b>0,008</b>
	Assoalho	12	0,941	0,041	0,944	
	Retromolar	5	0,916	0,083	0,958	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,978	NA	0,978	
Tabagista	Não	8	0,807	0,140	0,792	0,144
	Sim	31	0,883	0,116	0,927	

Tabela 11 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH2, considerando o grupo teste

<i>(conclusão)</i>						
Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Etilista	Não	15	0,805	0,150	0,795	0,053
	Sim	24	0,906	0,084	0,930	
T	1+2	13	0,871	0,139	0,931	0,768
	3+4	28	0,865	0,115	0,892	
N	0	18	0,859	0,118	0,927	0,462
	Demais	23	0,874	0,126	0,900	
Estádio clínico	Precoce	8	0,928	0,061	0,954	0,193
	Avançado	33	0,852	0,128	0,884	
Histopatológico	Bom	26	0,911	0,081	0,940	<b>0,025</b>
	Moderado	7	0,759	0,148	0,756	
	Pobre	8	0,821	0,144	0,839	
Margem	Livre	32	0,854	0,130	0,893	0,728
	Comprometida	7	0,905	0,070	0,929	
Recidiva	Não	16	0,862	0,137	0,915	0,775
	Sim	23	0,861	0,113	0,882	
Tratamento primário*	C	15	0,894	0,092	0,929	0,321
	RxT	1	0,982	NA	0,982	
	C+RxT	23	0,841	0,138	0,882	
	C+RxT+QT	2	0,911	0,102	0,911	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

Os resultados comparativos entre as variáveis clinicopatológicas e os marcadores imuno-histoquímicos (CYP1A1, CYP1B1, ALDH1 e ALDH2), considerando apenas os pacientes do grupo controle, estão exemplificados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15, respectivamente.

A expressão da CYP1A1 associou-se significativamente com as variáveis: gênero e estágio clínico ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada no gênero masculino e nos tumores em estágio clínico avançado, considerando o grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1A1, considerando o grupo controle

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	47	0,175	0,206	0,074	<b>0,031</b>
	Feminino	12	0,100	0,212	0,019	
Raça	Branca	49	0,152	0,202	0,051	0,396
	Não branca	10	0,201	0,244	0,074	
Local do Tumor	Língua	30	0,168	0,219	0,063	0,553
	Assoalho	13	0,137	0,144	0,111	
	Retromolar Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,009	NA	0,009	
Tabagista	Não	9	0,040	0,042	0,023	0,050
	Sim	45	0,178	0,215	0,074	
Etilista	Não	21	0,116	0,199	0,027	0,095
	Sim	33	0,180	0,205	0,116	
T	1+2	25	0,092	0,117	0,027	0,068
	3+4	34	0,210	0,245	0,0932	
N	0	25	0,138	0,201	0,027	0,230
	Demais	34	0,176	0,214	0,095	
Estádio clínico	Precoce	13	0,031	0,036	0,019	<b>0,002</b>
	Avançado	46	0,196	0,222	0,114	
Histopatológico	Bom	30	0,115	0,161	0,045	0,875
	Moderado	20	0,160	0,215	0,063	
	Pobre	3	0,129	0,166	0,054	
Tratamento primário*	C	22	0,092	0,108	0,031	0,050
	RxT	9	0,273	0,284	0,116	
	C+RxT	24	0,131	0,183	0,045	
	C+RxT+QT	3	0,499	0,346	0,591	
Recidiva	Não	20	0,085	0,119	0,025	0,368
	Sim	16	0,086	0,129	0,045	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da CYP1B1 associou-se significativamente com a variável T (extensão do tumor primário) ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada nos tumores T1+T2 (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da CYP1B1, considerando o grupo controle

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	47	0,997	0,002	0,997	0,571
	Feminino	12	0,998	0,0007	0,998	
Raça	Branca	49	0,997	0,0021	0,997	0,903
	Não branca	10	0,997	0,0010	0,997	
Tabagista	Não	9	0,998	0,001	0,998	0,068
	Sim	45	0,997	0,002	0,997	
Etilista	Não	21	0,998	0,001	0,998	0,114
	Sim	33	0,997	0,002	0,997	
T	1+2	25	0,997	0,002	0,998	<b>0,036</b>
	3+4	34	0,997	0,001	0,997	
N	0	25	0,997	0,001	0,998	0,438
	Demais	34	0,997	0,002	0,997	
Estádio clínico	Precoce	13	0,997	0,002	0,998	0,109
	Avançado	46	0,997	0,001	0,997	
Histopatológico	Bom	30	0,997	0,001	0,998	0,626
	Moderado	20	0,997	0,002	0,998	
	Pobre	3	0,997	0,001	0,997	
Local do tumor	Língua	30	0,997	0,0023	0,997	0,654
	Assoalho	13	0,997	0,0019	0,997	
	Retromolar	10	0,997	0,001	0,998	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,998	NA	0,998	
Tratamento primário*	C	22	0,997	0,002	0,997	0,418
	RxT	9	0,997	0,000	0,997	
	C+RxT	24	0,997	0,002	0,998	
	C+RxT+QT	3	0,997	0,001	0,998	
Recidiva	Não	20	0,997	0,002	0,998	0,389
	Sim	16	0,997	0,002	0,998	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da ALDH1 associou-se significativamente com as variáveis: tabagismo e gradação histopatológica ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada em pacientes tabagistas e com tumores pobremente diferenciados (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH1, considerando o grupo controle

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	47	0,123	0,2020	0,015	0,658
	Feminino	12	0,130	0,2940	0,006	
Raça	Branca	49	0,123	0,2101	0,008	0,975
	Não branca	10	0,131	0,2807	0,010	
Local do tumor	Língua	30	0,084	0,1881	0,006	0,095
	Assoalho	13	0,231	0,3053	0,058	
	Retromolar	10	0,156	0,2161	0,033	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,000	NA	0,000	
Tabagista	Não	9	0,005	0,0050	0,003	<b>0,037</b>
	Sim	45	0,126	0,2070	0,015	
Etilista	Não	21	0,103	0,2509	0,008	0,429
	Sim	33	0,107	0,1517	0,008	
T	1+2	25	0,139	0,2596	0,005	0,211
	3+4	34	0,114	0,1908	0,021	
N	0	25	0,157	0,2313	0,014	0,216
	Demais	34	0,100	0,2130	0,006	
Estádio clínico	Precoce	13	0,147	0,2635	0,004	0,447
	Avançado	46	0,118	0,2101	0,014	
Histopatológico	Bom	30	0,046	0,0907	0,006	<b>0,029</b>
	Moderado	20	0,195	0,2760	0,021	
	Pobre	3	0,382	0,4165	0,168	
Tratamento primário*	C	22	0,126	0,1929	0,011	0,297
	RxT	9	0,158	0,2593	0,057	
	C+RxT	24	0,083	0,1931	0,006	
	C+RxT+QT	3	0,107	0,1650	0,024	
Recidiva	Não	20	0,096	0,1457	0,008	0,258
	Sim	16	0,104	0,2306	0,003	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

A expressão da ALDH2 associou-se significativamente com a variável tabagismo ( $p < 0,05$ ). Sua maior expressão foi observada em pacientes tabagistas (Tabela 15).

Tabela 15 – Análise estatística comparativa entre as variáveis e a expressão da ALDH2, considerando o grupo controle

Variável	Categoria	n	Média	Desvio padrão	Mediana	p
Gênero	Masculino	47	0,898	0,114	0,943	0,644
	Feminino	12	0,881	0,139	0,899	
Raça	Branca	49	0,893	0,122	0,920	0,983
	Não branca	10	0,903	0,109	0,928	
Local do tumor	Língua	30	0,883	0,115	0,902	0,256
	Assoalho	13	0,936	0,079	0,972	
	Retromolar	10	0,901	0,169	0,971	
	Mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva	1	0,892	NA	0,892	
Tabagista	Não	9	0,835	0,141	0,887	<b>0,045</b>
	Sim	45	0,902	0,112	0,944	
Etilista	Não	21	0,859	0,134	0,888	0,138
	Sim	33	0,911	0,105	0,950	
T	1+2	25	0,891	0,114	0,915	0,514
	3+4	34	0,897	0,124	0,947	
N	0	25	0,909	0,116	0,950	0,296
	Demais	34	0,883	0,121	0,902	
Estádio clínico	Precoce	13	0,870	0,145	0,915	0,504
	Avançado	46	0,901	0,111	0,931	
Histopatológico	Bom	30	0,875	0,103	0,901	0,099
	Moderado	20	0,887	0,151	0,925	
	Pobre	3	0,967	0,043	0,991	
Tratamento primário*	C	22	0,871	0,124	0,902	0,127
	RxT	9	0,933	0,092	0,972	
	C+RxT	24	0,889	0,127	0,943	
	C+RxT+QT	3	0,966	0,041	0,983	
Recidiva	Não	20	0,866	0,114	0,886	0,887
	Sim	16	0,842	0,156	0,905	

Abreviações: C – Cirurgia; RxT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; NA – Não avaliável

### 5.3 Análise do prognóstico dos pacientes

#### 5.3.1 Sobrevida global

As análises das taxas de sobrevida global e dos riscos relativos à sobrevida global para cada marcador, considerando todos os pacientes juntos e separados por grupos, estão representados nas Tabelas 16 a 21 (Apêndice B) e nos gráficos das Figuras 7 a 18.

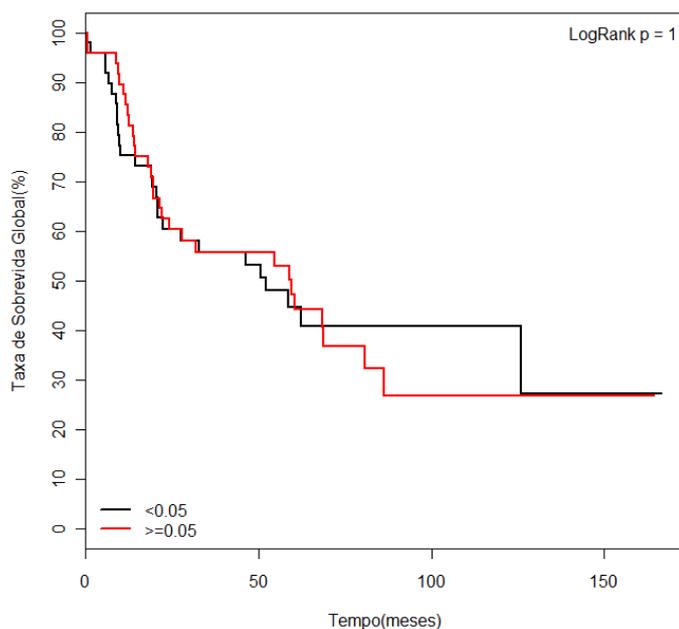


Figura 7 – Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1A1, sem distinção de grupo.

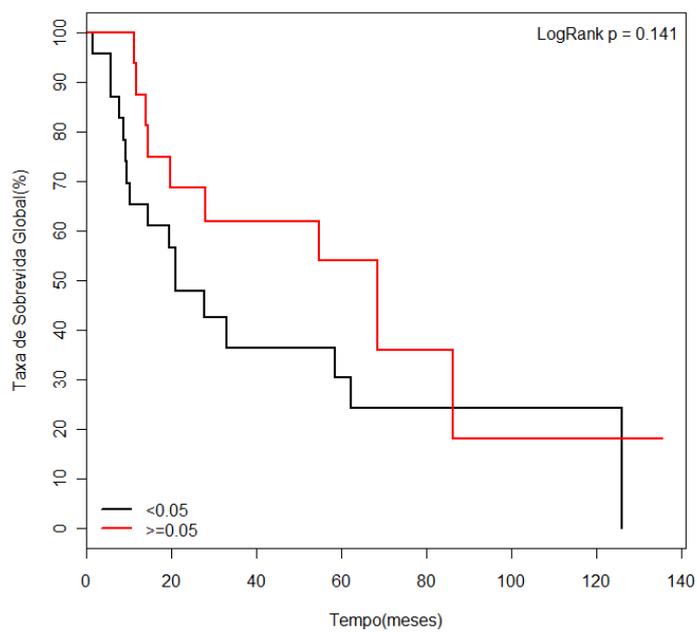


Figura 8 – Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1A1, considerando o grupo teste.

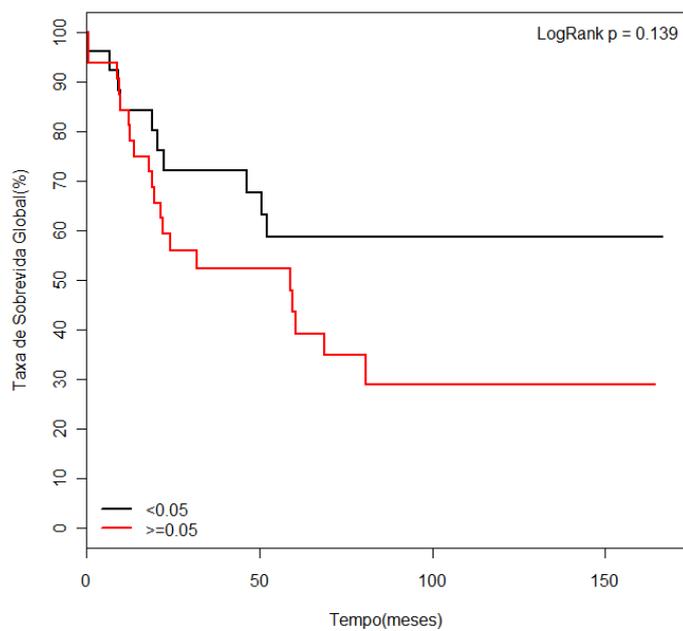


Figura 9 – Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1A1, considerando o grupo controle.

De acordo com os gráficos das Figuras 7 a 9 observa-se que a sobrevida global não difere entre o grupo que expressa a CYP1A1 e o grupo em que não há expressão ( $p > 0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a CYP1A1 demora mais tempo para vir a óbito, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito é o grupo em que não há expressão.

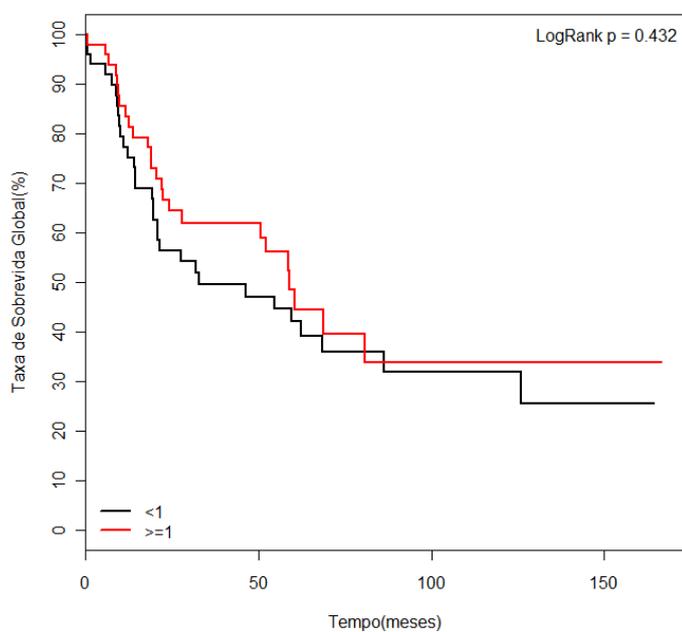


Figura 10 – Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1B1, sem distinção de grupo.

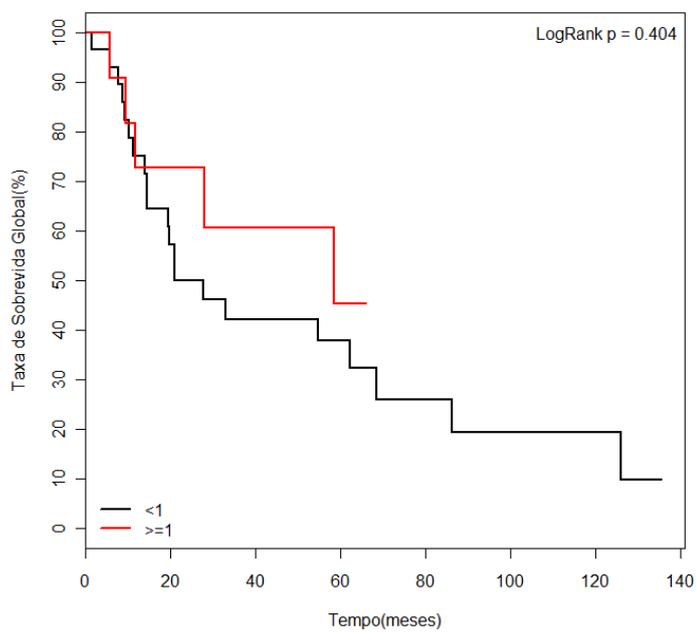


Figura 11– Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1B1, considerando o grupo teste.

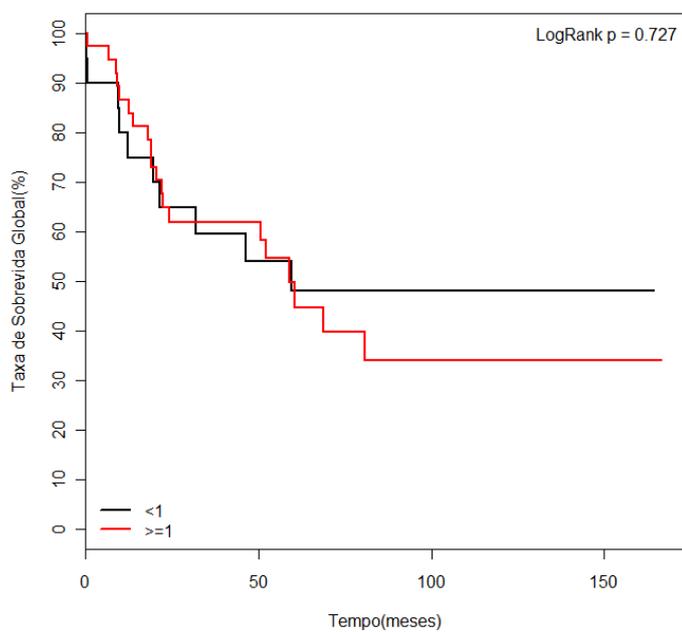


Figura 12– Gráfico representativo da sobrevida global para CYP1B1, considerando o grupo controle.

De acordo com os gráficos das Figuras 10 a 12 observa-se que a sobrevida global não difere entre o grupo que expressa a CYP1B1 e o grupo em que não há expressão ( $p > 0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a CYP1B1 demora mais tempo para vir a óbito, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito é o grupo que não há expressão.

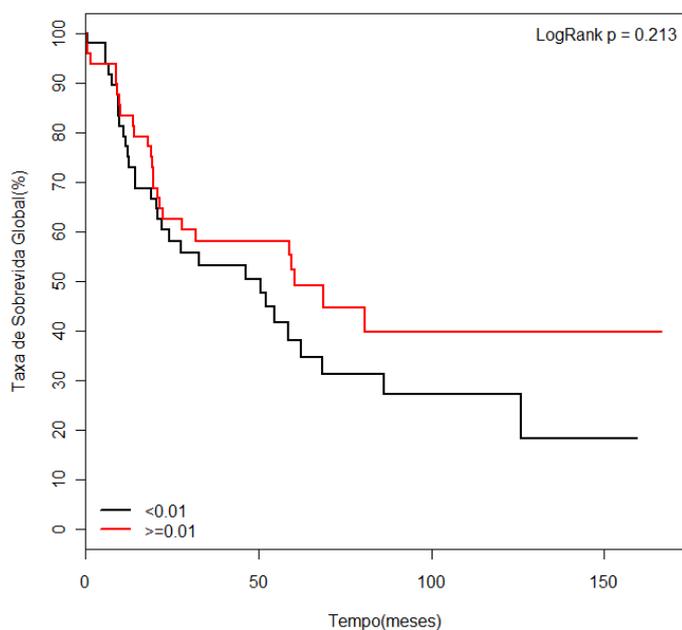


Figura 13 – Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH1, sem distinção de grupo.

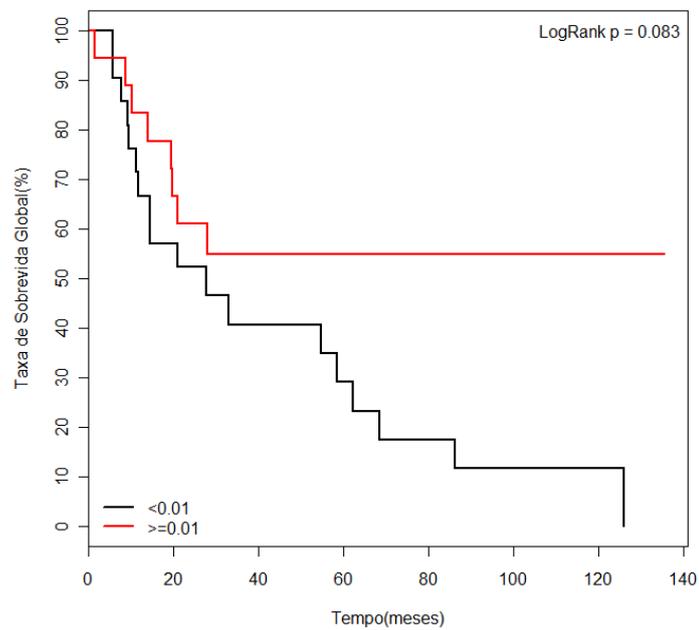


Figura 14 – Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH1, considerando o grupo teste.

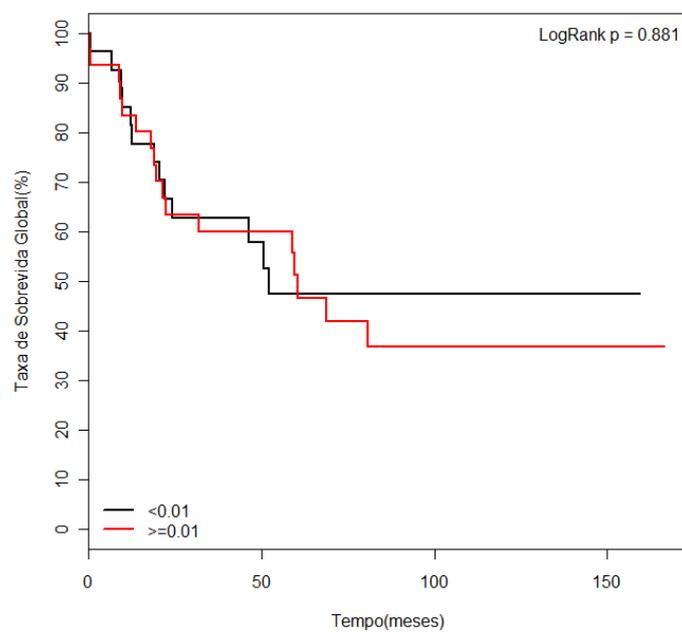


Figura 15 – Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH1, considerando o grupo controle.

De acordo com os gráficos das Figuras 13 a 15 observa-se que a sobrevida global não difere entre o grupo que expressa a ALDH1 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a ALDH1 demora mais tempo para vir a óbito, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito é o grupo que não há expressão.

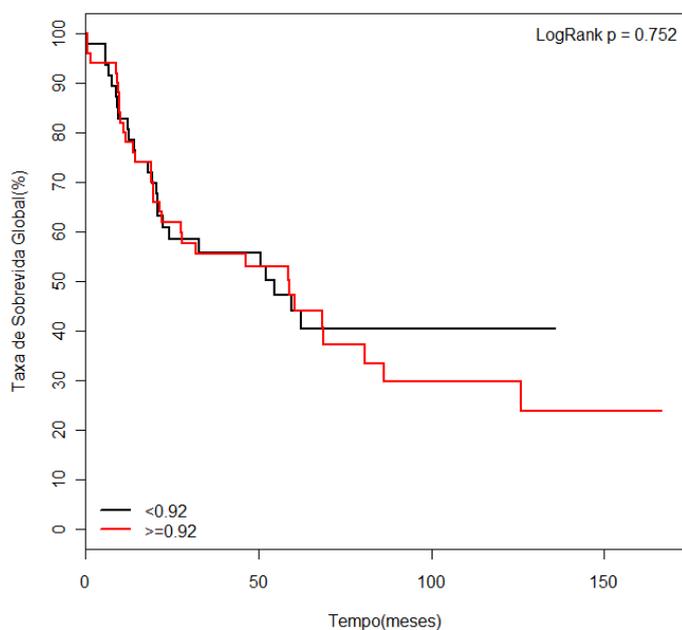


Figura 16 – Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH2, sem distinção de grupo.

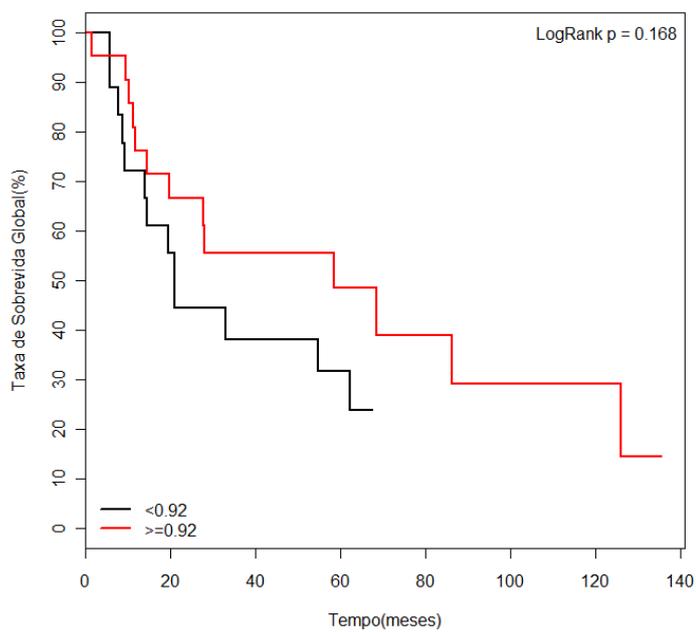


Figura 17 – Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH2, considerando o grupo teste.

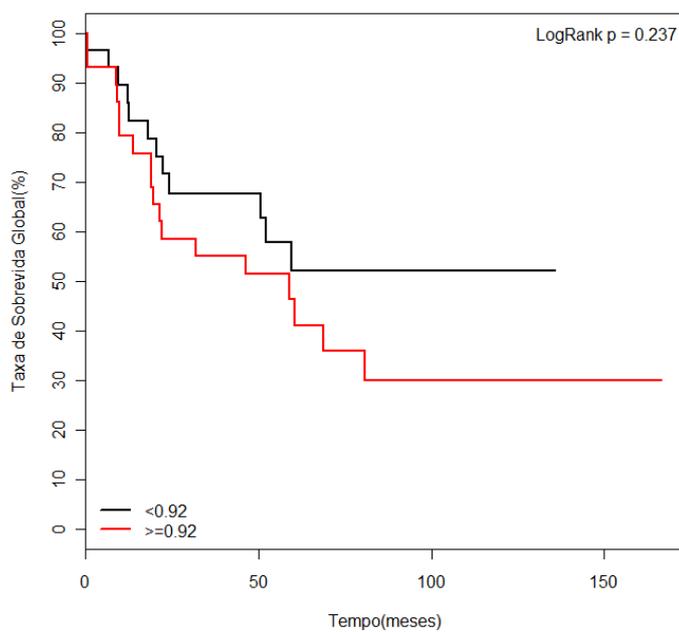


Figura 18– Gráfico representativo da sobrevida global para ALDH2, considerando o grupo controle.

Nos gráficos das Figuras 16 a 18 observa-se que a sobrevida global não difere entre o grupo que expressa a ALDH2 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a ALDH2 demora mais tempo para vir a óbito, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito é o grupo que não há expressão.

### 5.3.2 Sobrevida doença específica

As análises das taxas de sobrevida doença específica e dos riscos relativos à sobrevida doença específica para cada marcador, considerando todos os pacientes juntos e separados por grupos, estão expressas nas Tabelas 22 a 27 (Apêndice C) e nas Figuras 19 a 30.

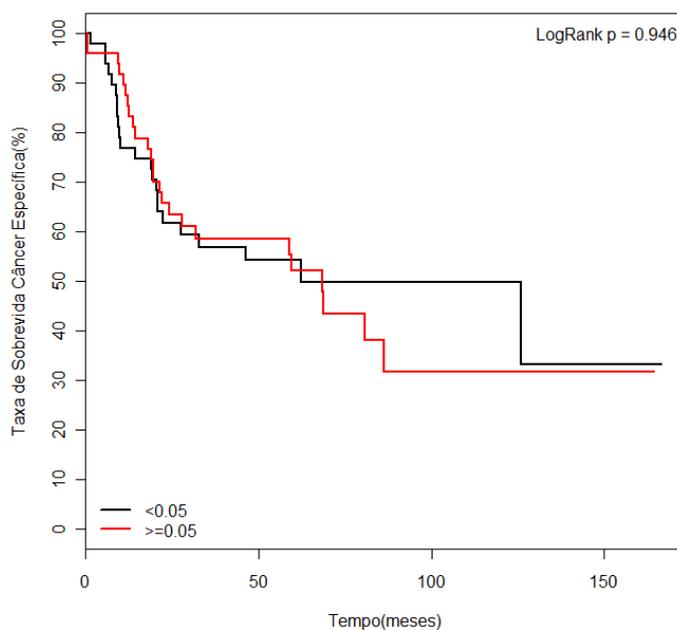


Figura 19– Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1A1, sem distinção de grupo.

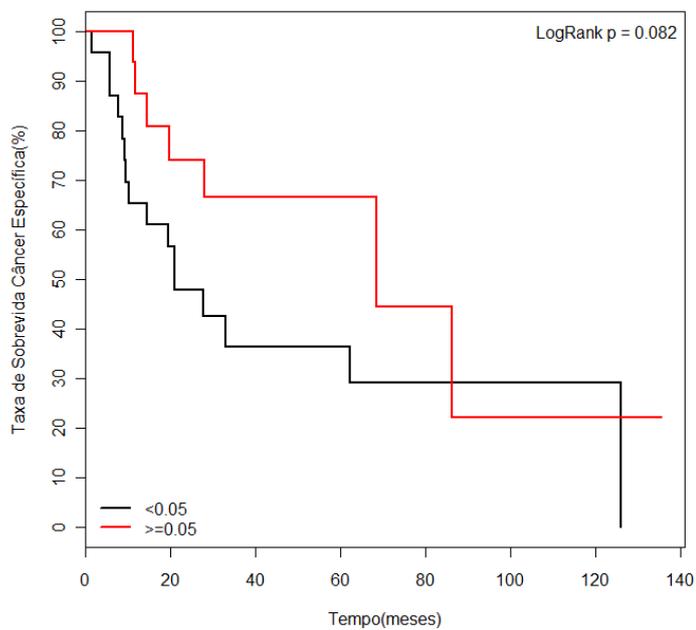


Figura 20 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1A1, considerando o grupo teste.

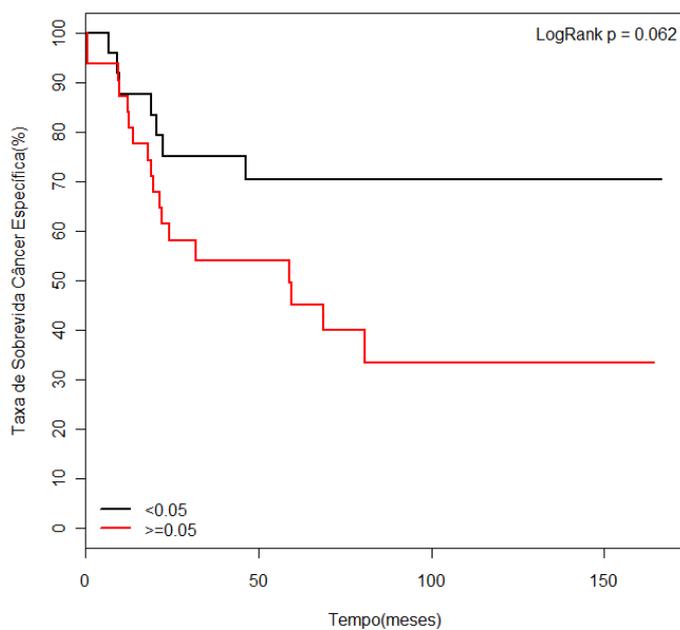


Figura 21 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1A1, considerando o grupo controle.

Nos gráficos das Figuras 19 a 21 observa-se que a sobrevida doença específica não difere entre o grupo que expressa a CYP1A1 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a CYP1A1 demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca é o grupo que não há expressão.

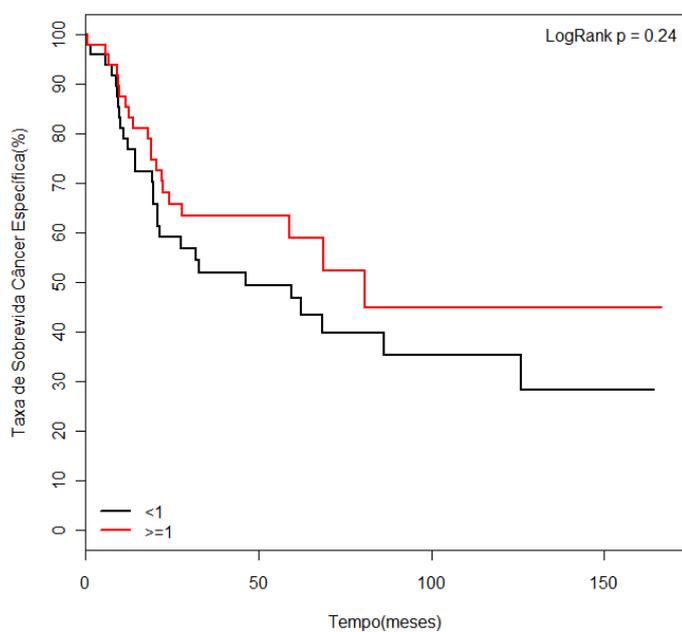


Figura 22 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1B1, sem distinção de grupo.

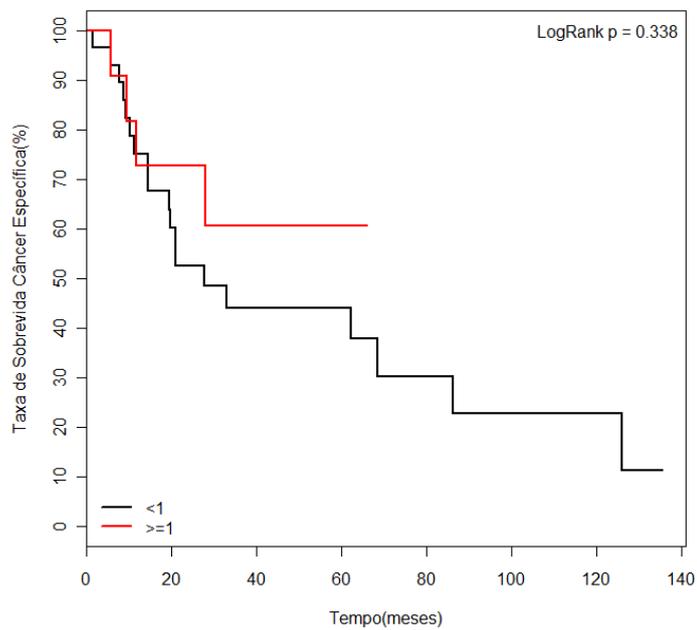


Figura 23 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1B1, considerando o grupo teste.

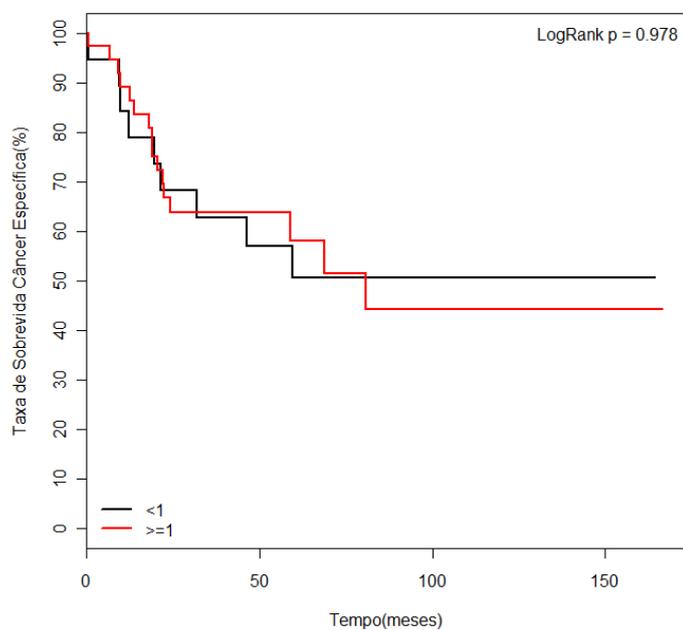


Figura 24 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para CYP1B1, considerando o grupo controle.

Nos gráficos das Figuras 22 a 24 observa-se que a sobrevida doença específica não difere entre o grupo que expressa a CYP1B1 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a CYP1B1 demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca é o grupo que não há expressão.

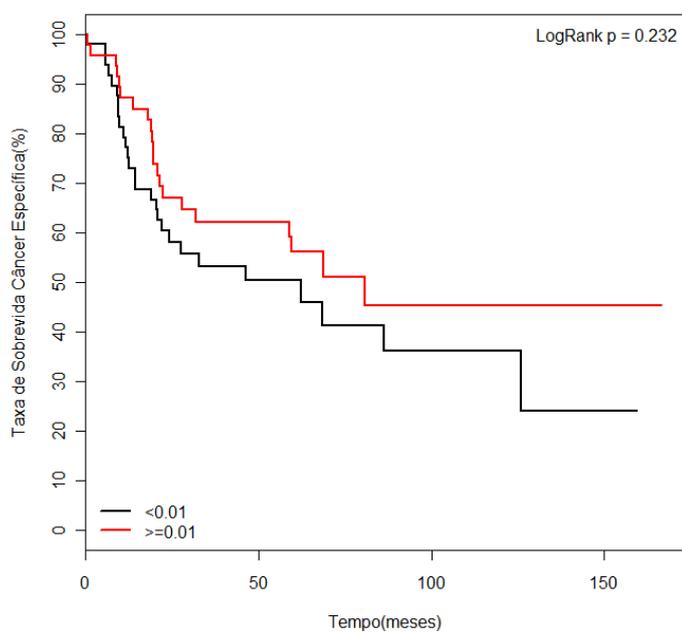


Figura 25 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH1, sem distinção de grupo.

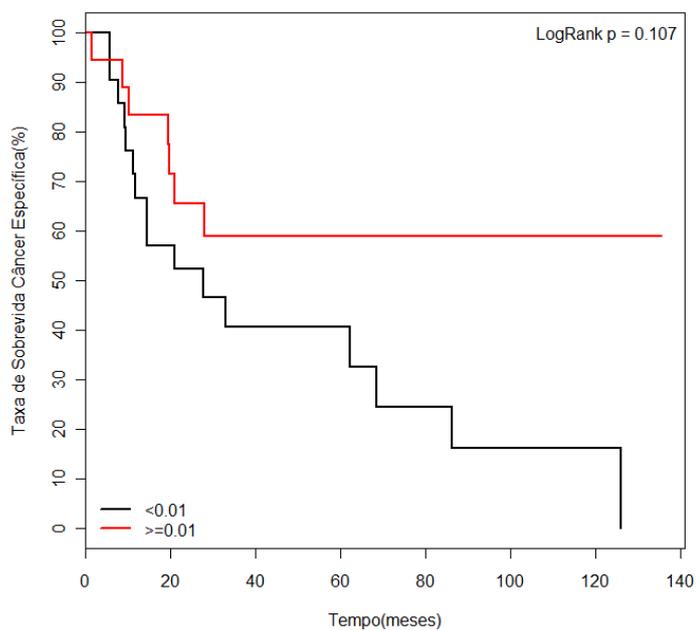


Figura 26 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH1, considerando o grupo teste.

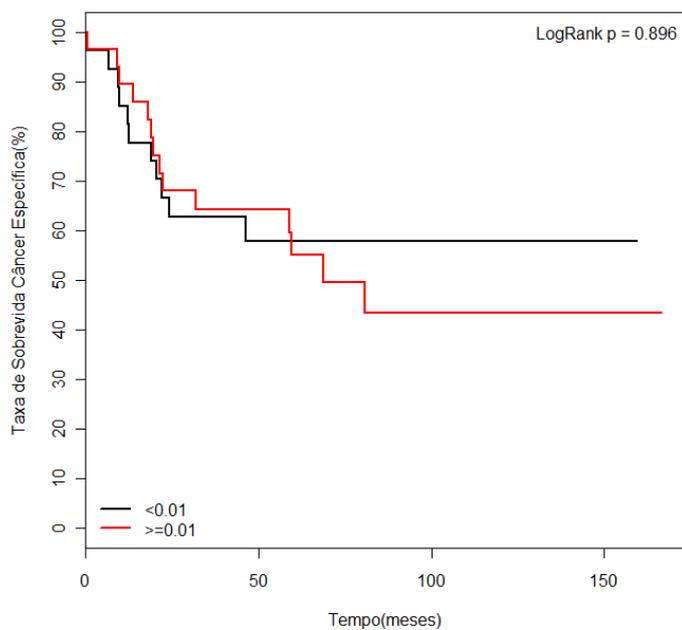


Figura 27 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH1, considerando o grupo controle.

Nos gráficos das Figuras 25 a 27 observa-se que a sobrevida doença específica não difere entre o grupo que expressa a ALDH1 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a ALDH1 demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca é o grupo que não há expressão.

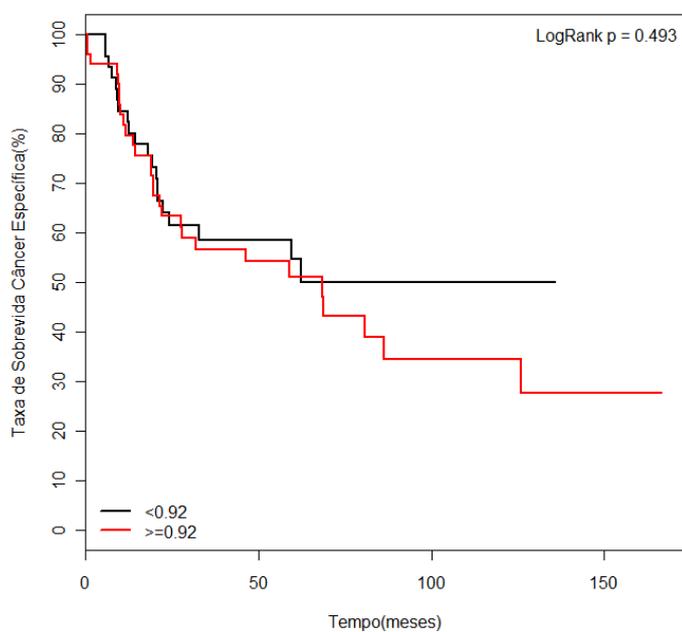


Figura 28 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH2, sem distinção de grupo.

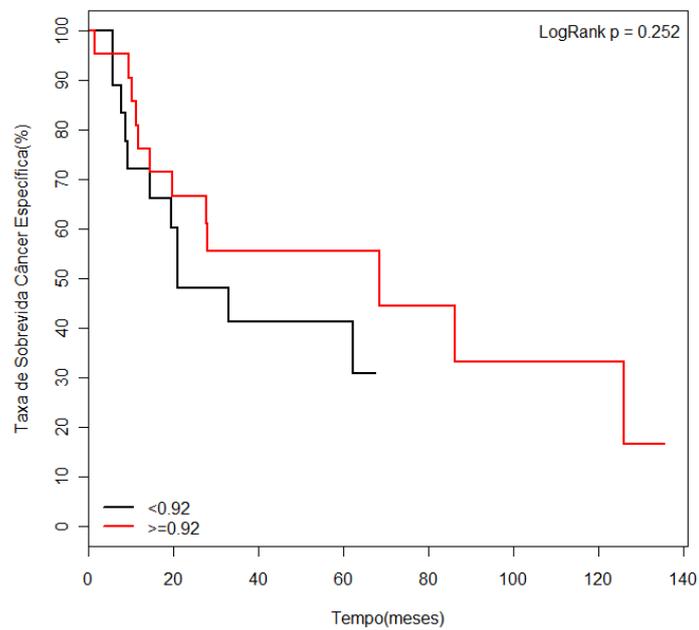


Figura 29 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH2, considerando o grupo teste.

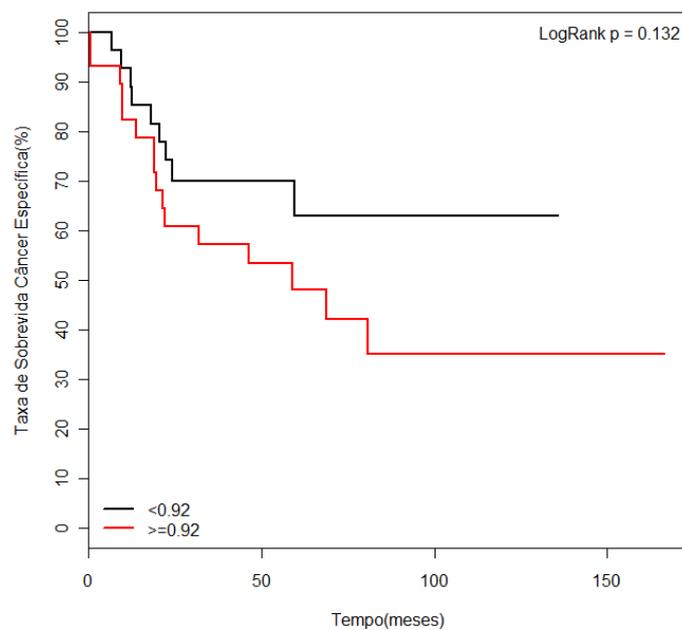


Figura 30 – Gráfico representativo da sobrevida doença específica para ALDH2, considerando o grupo controle.

Nos gráficos das Figuras 28 a 30 observa-se que a sobrevida doença específica não difere entre o grupo que expressa a ALDH2 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a ALDH2 demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para vir a óbito pelo CCE de boca é o grupo que não há expressão.

### 5.3.3 Sobrevida livre de recidiva

As análises das taxas de sobrevida livre de recidiva e dos riscos relativos à sobrevida livre de recidiva para cada marcador, considerando todos os pacientes juntos e separados por grupos, estão expressas nas Tabelas 28 a 33 (Apêndice D) e nas Figuras 31 a 42.

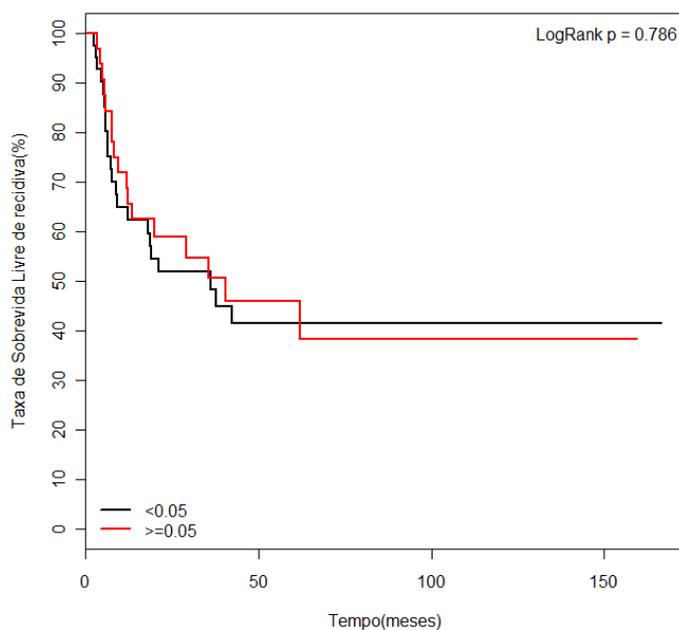


Figura 31 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1A1, sem distinção de grupo.

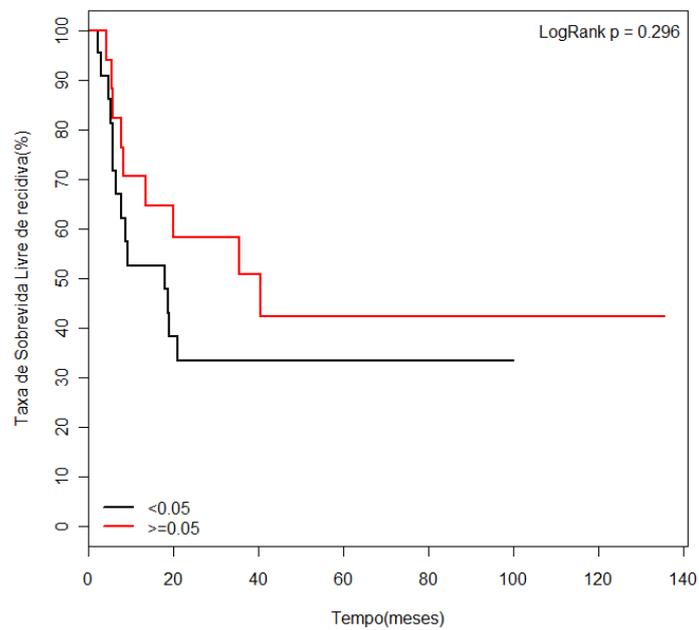


Figura 32 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1A1, considerando o grupo teste.

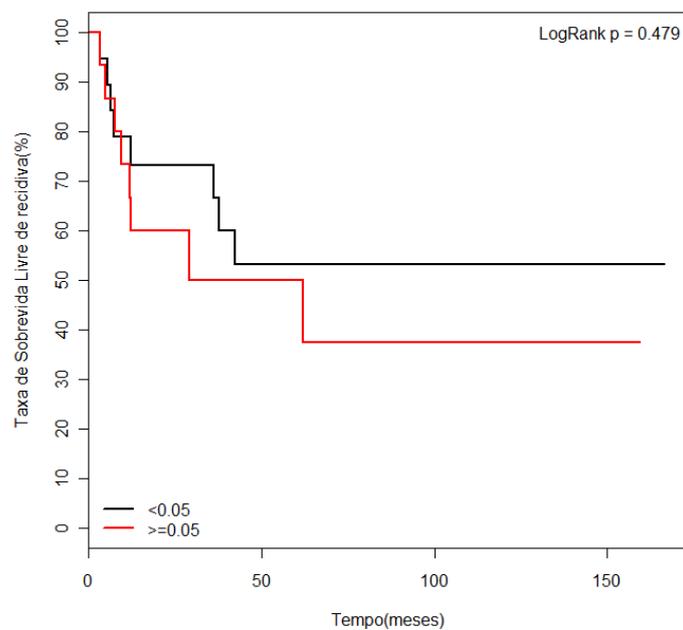


Figura 33 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1A1, considerando o grupo controle.

Os gráficos das Figuras 31 a 33 revelam que a sobrevida livre de recidiva não difere entre o grupo que expressa a CYP1A1 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a CYP1A1 demora mais tempo para apresentar recidiva da lesão, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para apresentar recidiva é o grupo que não há expressão.

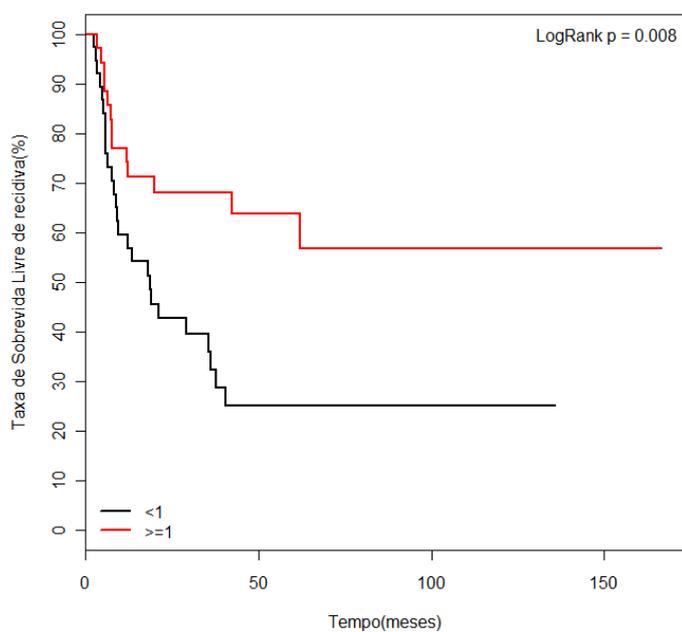


Figura 34 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1B1, sem distinção de grupo.

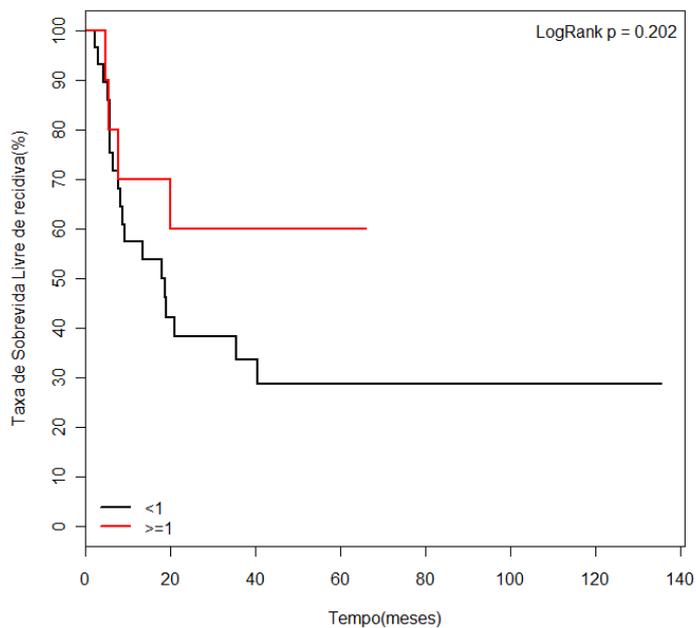


Figura 35 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1B1, considerando o grupo teste.

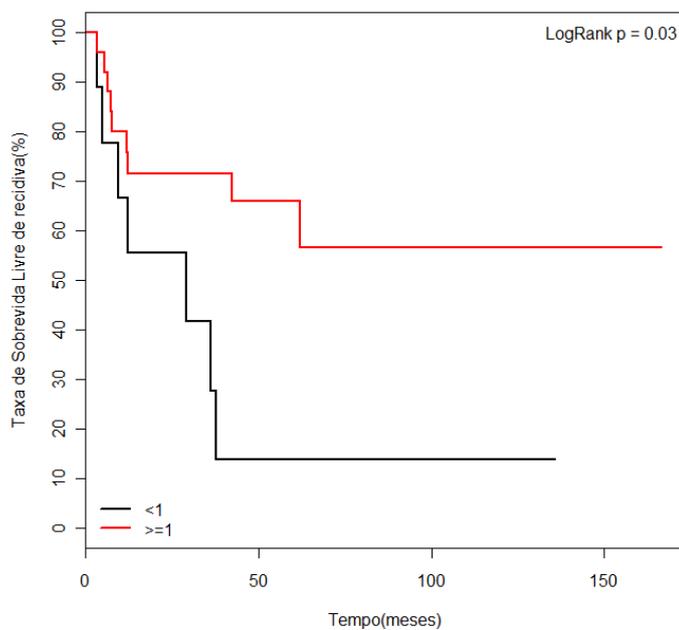


Figura 36 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para CYP1B1, considerando o grupo controle.

De acordo com os gráficos das Figuras 34 e 36 observa-se que a sobrevida livre de recidiva difere entre o grupo que expressa a CYP1B1 e o grupo que não a expressa ( $p < 0,05$ ). Sem distinção por grupo e considerando apenas no grupo controle quem expressa a CYP1B1 demora mais tempo para apresentar recidiva da lesão.

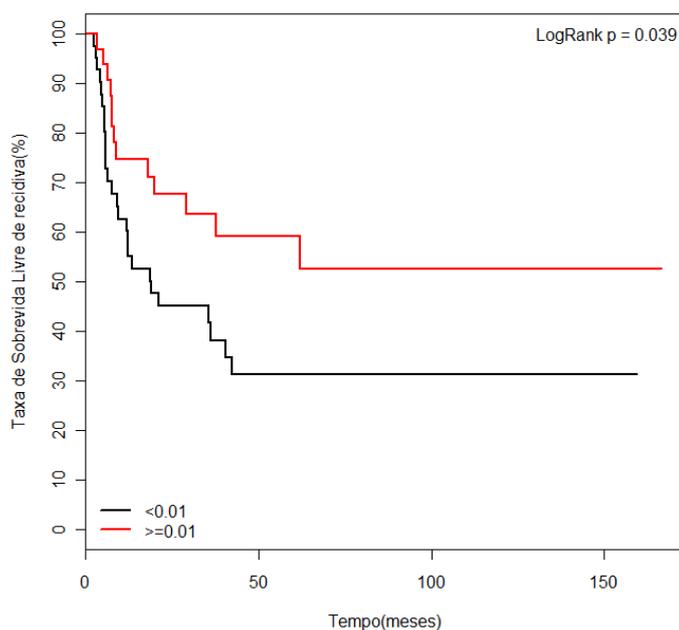


Figura 37 – Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH1, sem distinção de grupo.

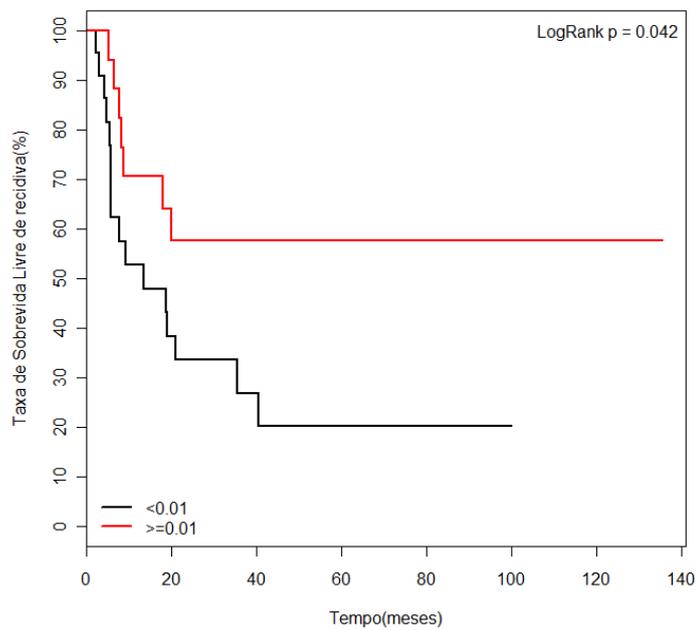


Figura 38– Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH1, considerando o grupo teste.

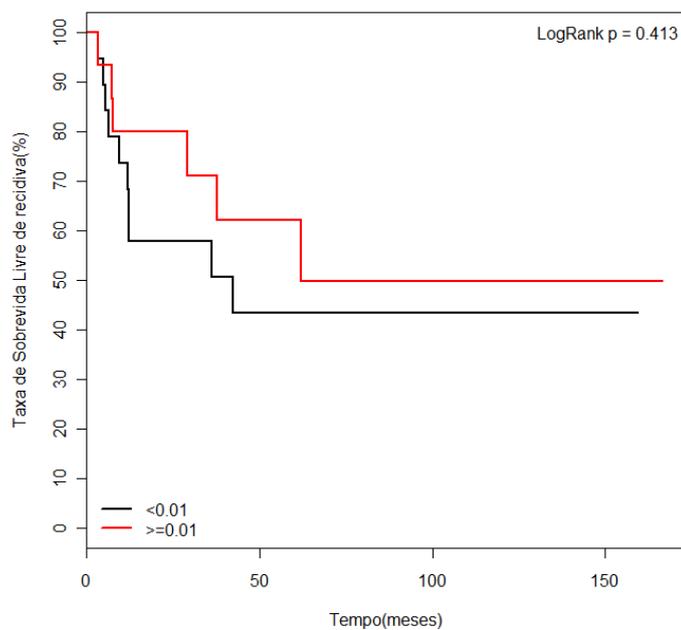


Figura 39– Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH1, considerando o grupo controle.

De acordo com os gráficos das Figuras 37 a 39 observa-se que a sobrevida livre de recidiva difere entre o grupo que expressa a ALDH1 e o grupo que não a expressa ( $p < 0,05$ ). Sem distinção por grupo e considerando apenas no grupo teste quem expressa a ALDH1 demora mais tempo para apresentar recidiva da lesão.

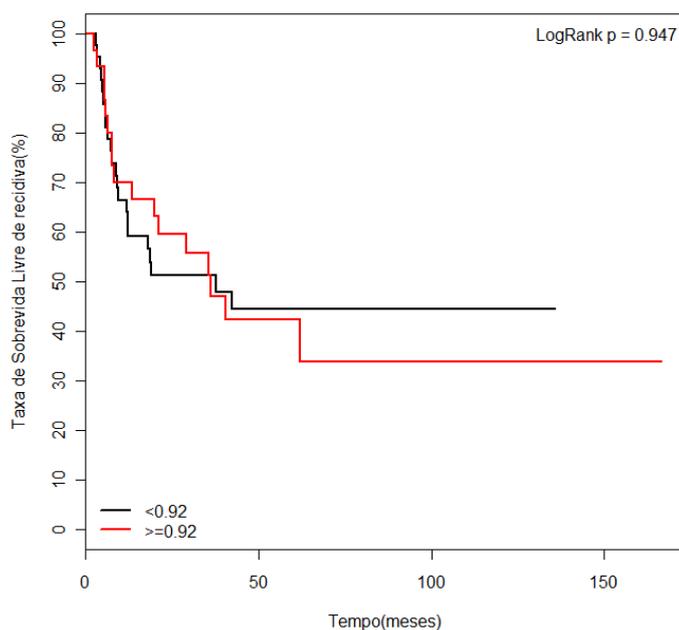


Figura 40– Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH2, sem distinção de grupo.

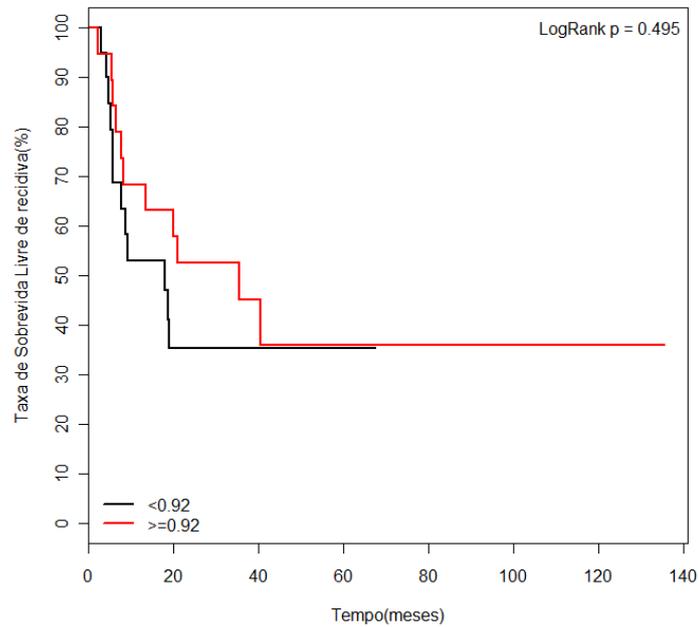


Figura 41– Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH2, considerando o grupo teste.

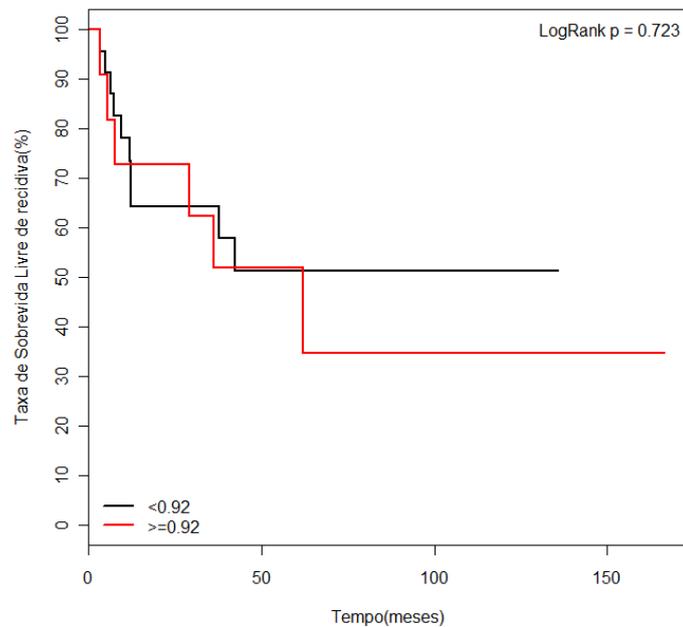


Figura 42– Gráfico representativo da sobrevida livre de recidiva para ALDH2, considerando o grupo controle.

Os gráficos das Figuras 40 a 42 revelam que a sobrevida livre de recidiva não difere entre o grupo que expressa a ALDH2 e o grupo em que não há expressão ( $p>0,05$ ). Apesar da não significância estatística, observamos que no grupo teste quem expressa a ALDH2 demora mais tempo para apresentar recidiva da lesão, enquanto que no grupo controle quem demora mais tempo para apresentar recidiva é o grupo que não há expressão.

## 6 DISCUSSÃO

O CCE de cabeça e pescoço está associado ao tabagismo e ao consumo de álcool (Khlifi et al., 2013). O CCE de boca é uma neoplasia epitelial maligna incomum em indivíduos com idade inferior a 40 anos (Kaminagakura et al., 2010). Estudos epidemiológicos mostram um aumento na incidência deste tumor nesta faixa etária em comparação com pacientes mais idosos (van Monsjou et al., 2013). Este grupo é caracterizado por um fenótipo clínico e etiológico distinto, muitas vezes não apresentam exposição significativa ao álcool e tabaco, e os locais mais afetados são principalmente a orofaringe e cavidade oral (Harris et al., 2010; van Monsjou et al., 2013). Há maior probabilidade de serem mulheres brancas e com tumores primários em língua em estágio clínico precoce (Harris et al., 2010). Entretanto, neste estudo os resultados revelaram, nos dois grupos estudados, um predomínio do gênero masculino, leucoderma, etilismo e/ou tabagismo associados, e de tumores primários em língua em estágio clínico avançado.

Hilly et al. (2013) relataram que o CCE de língua encontravam-se em estádios clínicos avançados nos pacientes mais jovens, e com maiores taxas de metástases regionais e à distância. A comparação por faixa etária não revelou predileção por sexo, diferença no grau histológico ou tumores T3 e T4, embolização vascular e invasão perineural. Neste estudo houve predomínio de tumores histologicamente bem diferenciados e com margem livre de lesão em ambos os grupos avaliados o índice de recidiva local foi de 33% nos jovens e 25% nos controles.

O fumo do tabaco expõe o fumante a uma série de produtos químicos carcinogênicos. As enzimas do citocromo P450

(CYP450), tais como a CYP1A1 e a CYP1B1 metabolizam estes agentes nocivos em seus derivados inativos, mas ocasionalmente convertem os produtos químicos em agentes carcinogênicos mais potentes (Khlifi et al., 2013). Além disso, via CYP450 oxidase o álcool é metabolizado em acetaldeído, sugerindo sua interação com os agentes carcinogênicos do tabaco e aumentando o risco de desenvolvimento de CCE (Khlifi et al., 2013). O álcool também é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase que oxida etanol a acetaldeído, um composto altamente tóxico às células (Johnson et al., 2005; Khlifi et al., 2013). A oxidação de acetaldeído a acetato é catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), principalmente a ALDH1 e ALDH2 (Boffetta, Hashibe, 2006; Visus et al., 2007).

Neste estudo não houve diferença significativa na imunexpressão da CYP1A1, ALDH1 e ALDH2 entre os grupos teste e controle ( $p > 0,05$ ). Foi observada uma hipoexpressão da CYP1A1, e em contraste, Chi et al. (2009) relataram uma hiperexpressão da CYP1A1 em células do CCE de boca. Quando se comparou os marcadores com as características clinicopatológicas dos pacientes, sem distinção de grupos, observou-se maior expressão da CYP1A1 no gênero masculino, em pacientes tabagistas e etilistas. Nos pacientes do grupo controle observou-se que a expressão da CYP1A1 foi maior no gênero masculino e nos tumores em estágio clínico avançado. Dados semelhantes foram reportados no estudo de Shukla et al. (2012) onde demonstraram que a hiperexpressão da CYP1A1 nos casos de CCE de boca foi mais prevalente em homens, tabagistas por longo período, e de maior idade.

Shukla et al. (2012) sugeriram que a enzima CYP1A1 altera significativamente o risco de câncer bucal, mas alertaram para a existência de diferenças na incidência de CCE entre várias regiões da cavidade oral. De acordo com Takiguchi et al. (2010) a expressão de CYP1A1 nos tecidos bucais, especialmente na língua, contribui para a ativação de substâncias tóxicas e para a diminuição da capacidade de

desintoxicação. Neste estudo, nos pacientes do grupo teste, a hiperexpressão da CYP1A1 foi observada nos tumores localizados na mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva.

Observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos para expressão da CYP1B1, sua maior expressão foi nos controles ( $p < 0,001$ ). Este fato pode estar associado ao maior tempo de exposição desses pacientes ao agente carcinogênico do tabaco. Contrastando com os achados de Pradhan et al. (2011) que verificaram que todos os casos de CCE de boca exibiram hipoexpressão da CYP1B1. Entretanto, estes autores não estratificaram os CCE por faixa etária. Relatos da expressão proteica da CYP1B1 em tecidos orais são controversos, podendo ser variáveis (Chi et al., 2009). Este é o primeiro estudo que avaliou a expressão destas enzimas metabolizadoras de drogas em diferentes grupos etários.

Pradhan et al. (2011) reportaram que a CYP1B1 foi hipoexpressa nos CCEs de boca e não houve associação entre sua expressão e o estágio TNM, gênero do paciente, topografia e etiologia. Neste estudo, a hiperexpressão da CYP1B1, foi observada nos tumores T1+T2 e com margens cirúrgicas livres de lesão nos 2 grupos estudados.

A hiperexpressão de ALDH1 no citoplasma de células tumorais de CCE foi correlacionada com a presença de metástase linfonodal (Yao et al., 2011; Luo et al., 2012; Michifuri et al., 2012). Yao et al. (2011) relataram a que os pacientes que apresentaram recidiva da doença foram os mais propensos à hiperexpressão de ALDH1. No grupo teste, observou-se que a maior expressão de ALDH1 foi correlacionada à ausência de recidiva, além de em tumores T1+T2 e em estágio clínico precoce. No grupo controle, observou-se maior expressão de ALDH1 nos pacientes tabagistas e nos tumores pobremente diferenciados.

De acordo com o estudo de Morita et al. (2005) a expressão da ALDH2 é correlacionada com a quantidade de bebida alcoólica ingerida, indicando que a exposição ao álcool pode induzir a

hiperexpressão de ALDH2 nas células epiteliais. Neste estudo, observou-se que nos mais idosos a expressão de ALDH2 foi maior nos pacientes tabagistas. Já nos pacientes mais jovens a hiperexpressão de ALDH2 foi observada nos tumores localizados na mucosa jugal, palato, rebordo e gengiva.

Analisando-se o prognóstico dos pacientes, observou-se que a sobrevida global e a sobrevida doença específica não diferem entre o grupo que expressa os marcadores estudados e o grupo em que não há expressão ( $p > 0,05$ ). Apesar da não significância estatística, houve uma tendência que no grupo teste os que exibiram maior expressão das enzimas metabolizadoras de drogas apresentaram melhor sobrevida global e sobrevida doença específica, enquanto que no grupo controle ocorreu o inverso.

É escasso na literatura trabalhos que descrevem a expressão proteica desses marcadores, porém há diversos trabalhos a respeito do polimorfismo genético dessas proteínas sobre a sobrevida dos pacientes com câncer.

Em 2013, Shukla et al. descreveram que não houve associação entre o gene CYP1A1 e sobrevida global dos pacientes com CCE de boca. Cardoso-Filho et al. (2013) relataram que pacientes com câncer de mama que apresentam polimorfismos do gene CYP1A1 desenvolveram tumores menos agressivos, mas não mostraram nenhuma evidência de melhor prognóstico.

Isaksson et al. (2014) estudaram a expressão dos genes CYP1B1, MTSS1, NCALD e NOP14 em pacientes com câncer de ovário. O *CYP1B1* foi sobre-expresso no grupo de pacientes com tumores pobremente diferenciados e foi significativamente associado com uma menor taxa de sobrevida global.

A análise imuno-histoquímica de Huang et al. (2014) revelou que as proteínas ALDH1, CD44, OCT4 e SOX2 foram sobre-expressas no CCE de língua, porém, a análise de regressão multivariada

de Cox demonstrou que a ALDH1 não pode ser utilizada como um indicador de prognóstico nos casos de CCE de língua.

Hakenewerth et al. (2013) identificaram alguns polimorfismos em genes do metabolismo de álcool e estresse oxidativo que influenciam a sobrevida de pacientes com CCE de cabeça e pescoço. Apenas o *CYP2E1* foi associado a uma menor sobrevida doença específica. Nenhuma associação consistente com a sobrevida global foi encontrada com os demais genes, entre eles o *ALDH2*.

Em relação a sobrevida livre de recidiva observamos diferença entre o grupo que apresenta imunoexpressão da CYP1B1 e da ALDH1, e o grupo em que não há expressão ( $p < 0,05$ ). Independente do grupo avaliado, quem expressa CYP1B1 e ALDH1 demora mais tempo para apresentar recidiva da lesão. Quando há estratificação dos grupos, no grupo controle da CYP1B1 e no grupo teste da ALDH1 observa-se o mesmo perfil. Esses dados sugerem que haja maior metabolização dos subprodutos carcinogênicos por estas enzimas, ajudando a evitar possíveis recidivas do CCE. Não há na literatura, estudos que compararam estas enzimas metabolizadoras de drogas com o prognóstico de pacientes com CCE de boca, diferenciando-os por faixa etária.

Harris et al. (2010) relataram que jovens com CCE de boca e sem uso abusivo de álcool e tabaco apresentaram melhor sobrevida global em relação aos pacientes com história de abuso dessas substâncias. Porém, a sobrevida livre de recidiva foi semelhante entre eles, podendo estar relacionada com o diagnóstico precoce de tumores em língua e na escolha do tratamento cirúrgico primário. Outros fatores possíveis incluem uma diminuição da incidência de comorbidades, tolerância à terapia antitumoral, ou a diminuição da ocorrência de metástases à distância nos pacientes jovens (Harris et al., 2010; van Monsjou et al. 2013). Além disso, pacientes mais idosos frequentemente

apresentam comorbidades associadas à exposição ao tabaco e ao álcool ao longo da vida (van Monsjou et al., 2013).

Kaminagakura et al. (2010) relataram no estudo epidemiológico com CCE de boca que não houve diferença significativa na sobrevida global entre os pacientes jovens e mais idosos, apesar da taxa de recidiva ser maior nos mais jovens. O estudo de Hilly et al. (2013) com CCE em língua também revelou que não houve diferenças entre os grupos etários (jovens  $\leq 30$  anos e idosos  $> 60$  anos) em relação a sobrevida global e a sobrevida livre de doença. A recorrência foi documentada em uma proporção similar nos pacientes (38% nos jovens e 29,9% nos idosos) (Hilly et al., 2013).

Em 2013, Durr et al. relataram em seu estudo que em ambos os grupos de fumantes e não fumantes os CCEs seguiram um curso progressivo e agressivo. Mesmo quando diagnosticados numa fase inicial, a doença foi resistente ao tratamento. A maior profundidade de invasão tumoral, metástase nodal e estágio avançado do tumor foram independentes de diminuição da sobrevida global. A presença de invasão perineural e linfática foi igualmente associada ao aumento da recorrência (Durr et al., 2013).

Este estudo destaca a importância da expressão das enzimas metabolizadoras de drogas no CCE de boca, especialmente nos pacientes usuários crônicos de tabaco.

## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- a) não houve diferença estatisticamente significativa na expressão proteica da CYP1A1, ALDH1 e ALDH2 entre os grupos avaliados;
- b) a expressão da CYP1B1 foi maior no grupo controle;
- c) a hiperexpressão das enzimas metabolizadoras de drogas foi observada, predominantemente, nos pacientes tabagistas, independentemente dos grupos estudados;
- d) a sobrevida global e a sobrevida doença específica não diferiram entre o grupo que expressa os marcadores estudados e o grupo em que não há expressão ( $p > 0,05$ );
- e) a sobrevida livre de recidiva revelou diferença entre o grupo que apresentou imunexpressão da CYP1B1 e da ALDH1, e o grupo em que não há expressão ( $p < 0,05$ ). Quanto maior a expressão desses marcadores, maior a sobrevida livre de recidiva.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 2009 Jun 16;9:187.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987;95(3):229-49.

Badal S, Delgoda R. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *J Appl Toxicol*. 2014;34(7):743-53.

Bodner L, Manor E, Friger MD, Van der Waal I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger – Review and analysis of 186 reported cases. *Oral Oncol*. 2014;50(2):84-9.

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7(2):149-56.

Boonyaratanakornkit JB, Yue L, Strachan LR, Scalapino KJ, LeBoit PE, Lu Y, et al. Selection of tumorigenic melanoma cells using ALDH. *Invest Dermatol*. 2010 Dec;130(12):2799-808.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992;166(4):375-81.

Brunotto M, Zarate AM, Bono A, Barra JL, Berra S. Risk genes in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of last 5 years. *Oral Oncol*. 2014;50(3):178-88.

Cardoso-Filho C, Sarian LO, de Oliveira CB, da Silveira Bossi L, Lourenço GJ, Lima CS, et al. Clinical effects of A4889G and T6235C polymorphisms in cytochrome P-450 CYP1A1 for breast cancer patients treated with tamoxifen: implications for tumor aggressiveness and patient survival. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Sep;72(3):529-35.

---

\*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Chi AC, Appleton K, Henriod JB, Krayner JW, Marlow NM, Bandyopadhyay D, et al. Differential induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo[a]pyrene in oral squamous cell carcinoma cell lines and by tobacco smoking in oral mucosa. *Oral Oncol.* 2009;45(11):980-5.

Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Sittitrai P, Pattarasakulchai T, Tharavichitkul E, Sriuthaisiriwong P, et al. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncol.* 2006;42(1):83-8.

Cordero K, Espinoza I, Caceres D, Roco A, Miranda C, Squicciarini V, et al. Oral cancer susceptibility associated with the CYP1A1 and GSTM1 genotypes in Chilean individuals. *Oncol Lett.* 2010 May;1(3):549-53.

Crous-Bou M, Rennert G, Cuadras D, Salazar R, Cordero D, Salt Rennert H, et al. Polymorphisms in alcohol metabolism genes ADH1B and ALDH2, alcohol consumption and colorectal cancer. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e80158.

Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck.* 2001;23(4):273-9.

Durr ML, van Zante A, Li D, Kezirian EJ, Wang SJ. Oral tongue squamous cell carcinoma in never-smokers: analysis of clinicopathologic characteristics and survival. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013 Jul;149(1):89-96.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007 Nov;1(5):555-67.

Gong Y, Wang J, Huo L, Wei W, Ueno NT, Woodward WA. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in inflammatory breast cancer as measured by immunohistochemical staining. *Clin Breast Cancer.* 2014;14(3):e81-8.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, et al. *American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual and Handbook.* 6th ed. New York, NY, USA: Springer Verlag. 2002. p.484.

Hakenewerth AM, Millikan RC, Rusyn I, Herring AH, Weissler MC, Funkhouser WK et al. Effects of polymorphisms in alcohol metabolism and oxidative stress genes on survival from head and neck cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013 Aug;37(4):479-91.

Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN, Couch ME, Rosenman JG. Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of Young patients with head and neck squamous cell cancers. *Head Neck*. 2010 Apr;32(4):499-503.

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*. 2007;99(10):777-89.

Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrachi A, Hamzany Y, et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol*. 2013 Oct;49(10):987-90.

Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Aug;43(7):492-8.

Hwang PH, Lian L, Zavras AI. Alcohol intake and folate antagonism via CYP2E1 and ALDH1: effects on oral carcinogenesis. *Med Hypotheses*. 2012 Feb;78(2):197-202.

Hyam DM, Conway RC, Sathiyaseelan Y, Gebiski V, Morgan GJ, Walker DM, et al. Tongue cancer: do patients younger than 40 do worse? *Aust Dent J*. 2003 Mar;48(1):50-4.

Isaksson HS, Sorbe B, Nilsson TK. Whole genome expression profiling of blood cells in ovarian cancer patients -prognostic impact of the CYP1B1, MTSS1, NCALD, and NOP14. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4040-9.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG, et al. Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC Press; 2005. p.168-175.

Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, dos Santos CR, Kowalski LP. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Head Neck*. 2010;32(11):1460-6.

Kaminagakura E, Werneck da Cunha I, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Head Neck*. 2011;33(10):1413-9.

Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int. J. Cancer*. 2012;130(8):1726-32.

Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, et al. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer*. 1999 Nov 26;83(5):606-9.

Khelifi R, Messaoud O, Rebai A, Hamza-Chaffai A. Polymorphisms in the human cytochrome P450 and arylamine *N*-Acetyltransferase: susceptibility to head and neck cancers. *Biomed Res Int*. 2013:582768.

Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*. 1998;19(10):1847-53.

Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C, et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1992 Oct;28B(2):113-20.

Lira AAB, Godoy GP, Gomes DQC, Pereira JVCFW, Pinto LP. Carcinoma de células escamosas indiferenciado em paciente jovem: relato de caso. *Int J Dent*. 2009;8(3):172-6.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. *Oral Oncol*. 2001;37(5):401-18.

Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol*. 2003;39(2):106-14.

Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol*. 2004;40(3):304-13.

Luo WR, Gao F, Li SY, Yao KT. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2012 Dec;61(6):1072-81.

Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(2):167-73.

Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A, Rey-Barja N, Aguirre-Urizar JM. Oral cancer and polymorphism of ethanol metabolising genes. *Oral Oncol.* 2010;46(1):9-13.

Matsuda T, Yabushita H, Kanaly RA, Shibutani S, Yokoyama A. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(10):1374-8.

Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int.* 2012 Oct;62(10):684-9.

Morita M, Oyama T, Kagawa N, Nakata S, Ono K, Sugaya M, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 2 in the normal esophageal epithelium and alcohol consumption in patients with esophageal cancer. *Frontiers in Bioscience.* 2005 Sep;10:2319-24.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122(1):44-51.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:297-316.

Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(4):735-46.

Nebert DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res.* 1991;247(2):267-81.

Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol.* 2000 Jan;36(1):42-6.

Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and MnSOD in a panel of human cancer cell lines. *Mol Cell Biochem.* 2013 Nov;383(1-2):95-102.

Pitman KT, Johnson JT, Wagner RL, Myers EN. Cancer of the tongue in patients less than forty. *Head Neck*. 2000;22(3):297-302.

Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol*. 2014 Mar;50(3):168-77.

Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, Marshak G, Ulanovski D, Feinmesser R. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope*. 2004;114(5):915-7.

Pradhan S, Nagashri MN, Gopinath KS, Kumar A. Expression profiling of CYP1B1 in oral squamous cell carcinoma: counterintuitive downregulation in tumors. *PLoS One*. 2011;6(11):e27914.

Qian X, Wagner S, Ma C, Klussmann JP, Hummel M, Kaufmann AM, et al. ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status. *Oncol Reports*. 2013;29(5):1777-84.

Qian X, Wagner S, Ma C, Coords A, Gekeler J, Klussmann JP, et al. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Jul;140(7):1151-8.

Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefelf ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009;47(2):95-8.

Ruwali M, Pant MC, Shah PP, Mishra BN, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. *Mutat Res*. 2009 Oct 2;669(1-2):36-41.

Sacks PG, Zhao ZL, Kosinska W, Fleisher KE, Gordon T, Guttenplan JB. Concentration dependent effects of tobacco particulates from different types of cigarettes on expression of drug metabolizing proteins, and benzo(a)pyrene metabolism in primary normal human oral epithelial cells. *Food Chem Toxicol*. 2011 Sep;49(9):2348-55.

Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(3):129-33.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(4):257-76.

Shukla D, Kale AD, Hallikerimath S, Vivekanandhan S, Venkatakanthaiah Y. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (GSTM1 and CYP1A1) as risk factors for oral premalignant lesions and oral cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012 Sep;156(3):253-9.

Shukla D, Dinesh Kale A, Hallikerimath S, Yerramalla V, Subbiah V, Mishra S. Association between GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and survival in oral cancer patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Dec;157(4):304-10.

Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin. Otolaryngol.* 2010;35(4):307-312.

Takiguchi M, Darwish WS, Ikenaka Y, Ohno M, Ishizuka M. Metabolic activation of heterocyclic amines and expression of CYP1A1 in the tongue. *Toxicol Sci.* 2010;116(1):79-91.

Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. *Head Neck Pathol.* 2009;3(3):246-8.

Tremblay S, Pintor dos Reis P, Bradley G, Galloni NN, Perez-Ordóñez B, Freeman J, et al. Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Sep;132(9):958-66.

Tsai ST, Wong TY, Ou CY, Fang SY, Chen KC, Hsiao JR, et al. The interplay between alcohol consumption, oral hygiene, ALDH2 and ADH1B in the risk of head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2014 Nov 15;135(10):2424-36.

Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich N, Eckardt AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head Neck Oncol.* 2012;4:28.

van Monsjou HS, Wreesmann VB, van den Brekel MW, Balm AJ. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol.* 2013 Dec;49(12):1097-102.

Visus C, Ito D, Amoscato A, Maciejewska-Franczak M, Abdelsalem A, Dhir R, et al. Identification of Human Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1 as a Novel CD8+ T-Cell-Defined Tumor Antigen in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Res.* 2007;67(1):10538-45.

Wang K, Chen X, Zhan Y, Jiang W, Liu X, Wang X, et al. Increased expression of ALDH1A1 protein is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Med Oncol.* 2013;30(2):574.

Wang HL, Zhou PY, Liu P, Zhang Y. ALDH2 and ADH1 genetic polymorphisms may contribute to the risk of gastric cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Mar 14;9(3):e88779.

Warnakulasuriya S, Mak V, Moller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol.* 2007;43(10):982-6.

Warren S, Gates O. Multiple malignant tumours: a statistical study. *Am J cancer.* 1932;16:1358-69.

Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z. The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Med Sci Monit.* 2011;17(8):HY21-26.

Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, Souda M, Sagara Y, Sagara Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study. *Histopathology.* 2011 Mar;58(4):608-16.

Zhao H, Liu KJ, Lei ZD, Lei SL, Tian YQ. Meta-analysis of the aldehyde dehydrogenases-2 (ALDH2) Glu487Lys polymorphism and colorectal cancer risk. *PLoS One.* 2014 Feb 18;9(2):e88656.

## APÊNDICE A – Gráficos de correlações entre os marcadores

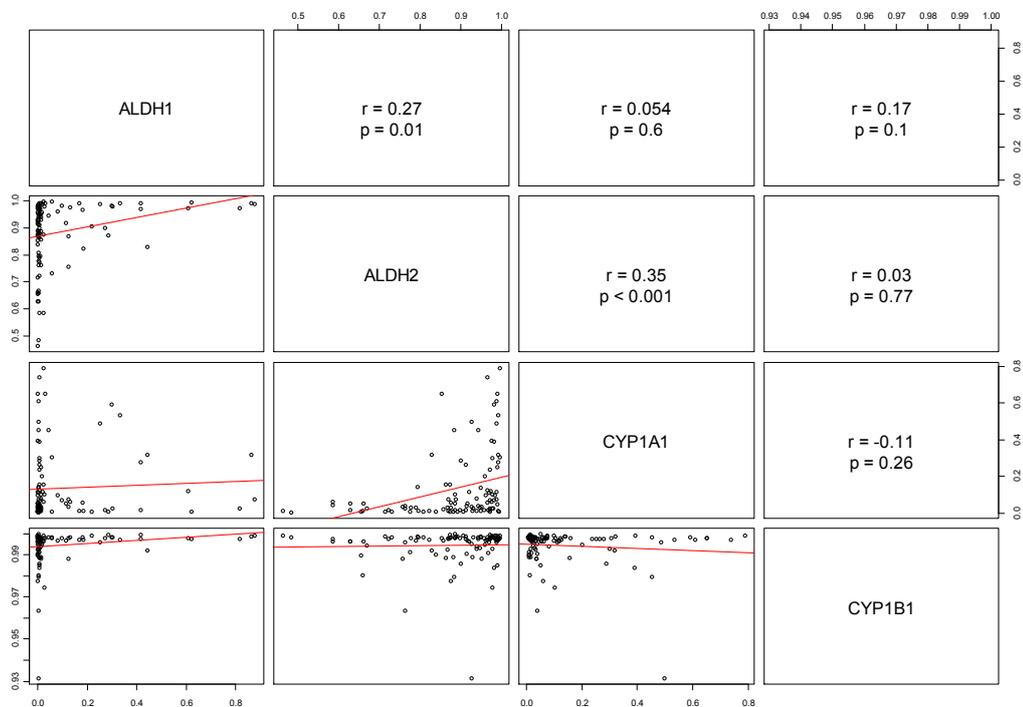


Figura 43 – Gráfico de correlações entre os marcadores, sem distinção de grupo.

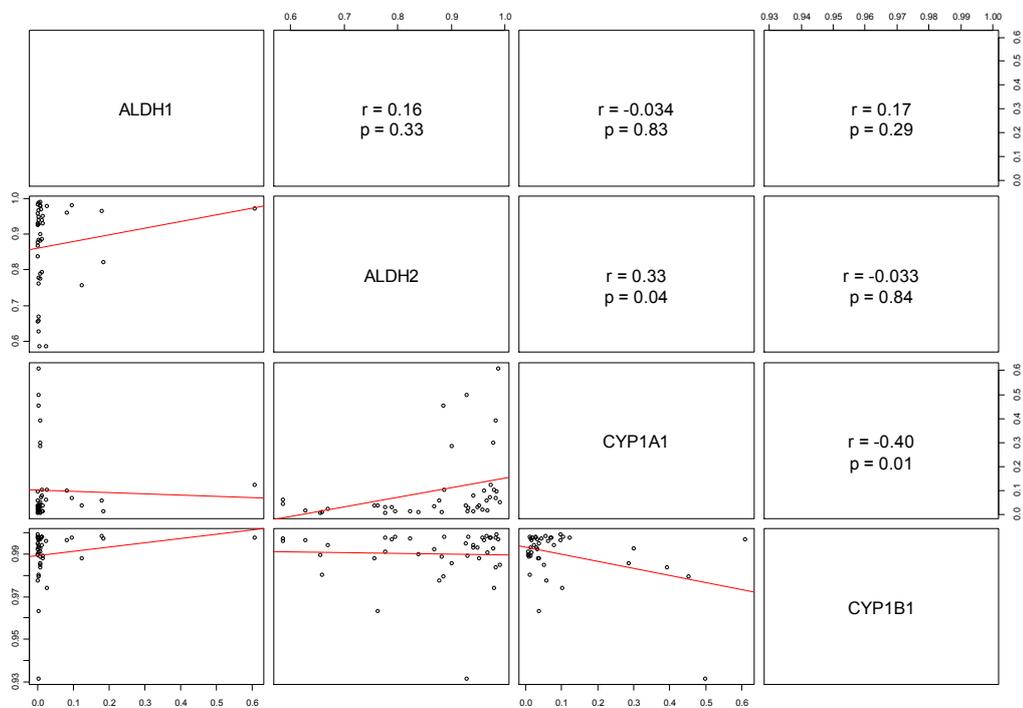


Figura 44 – Gráfico de correlações entre os marcadores e o grupo teste.

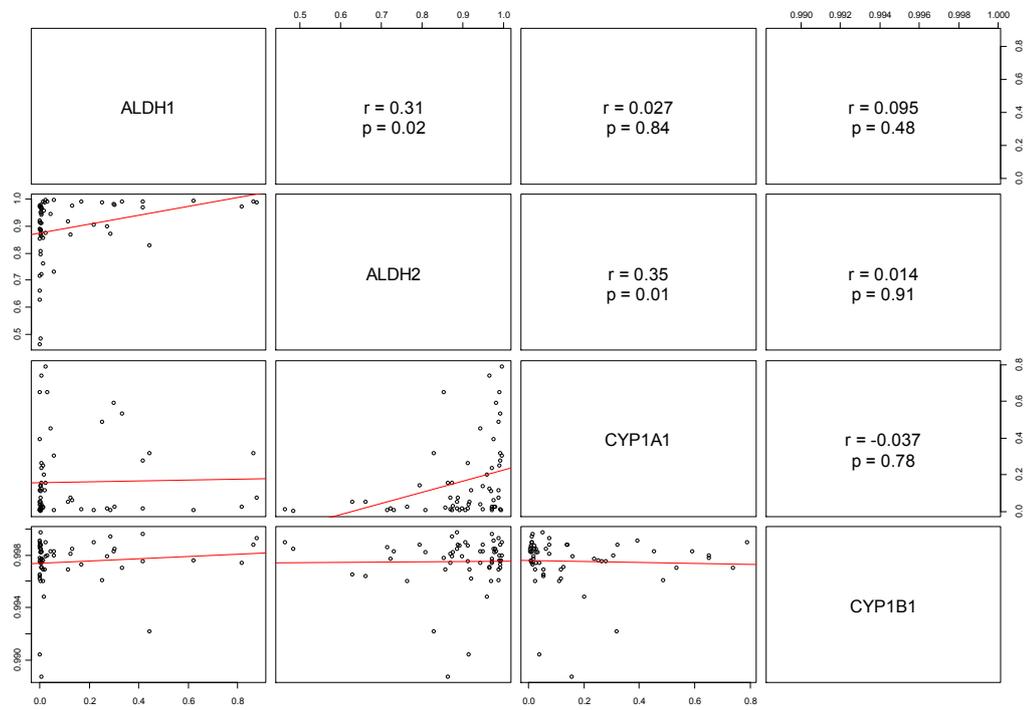


Figura 45 – Gráfico de correlações entre os marcadores e o grupo controle.

**APÊNDICE B – Tabelas de análise de sobrevida global**

Tabela 16 – Análise das taxas de sobrevida global (SG) para cada marcador, sem distinção de grupo

Marcador	Categoria	n	SG - 5 anos	SG - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	50	45%	41%	52,3
	>=0.05	49	47%	27%	59,6
CYP1B1	<1	50	42%	32%	32,9
	>=1	49	49%	34%	58,8
ALDH1	<0.01	50	38%	27%	50,7
	>=0.01	49	52%	40%	60,5
ALDH2	<0.92	49	44%	40%	54,6
	>=0.92	50	47%	30%	58,8

Tabela 17 – Análise das taxas de sobrevida global (SG) para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	SG - 5 anos	SG - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	24	30%	24%	20,9
	>=0.05	17	54%	18%	68,4
CYP1B1	<1	30	38%	19%	27,6
	>=1	11	45%	45%	58,5
ALDH1	<0.01	23	29%	12%	27,6
	>=0.01	18	55%	55%	-
ALDH2	<0.92	20	32%	24%	20,9
	>=0.92	21	49%	29%	58,5

Tabela 18 – Análise das taxas de sobrevida global (SG) para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	Categoria	n	SG - 5 anos	SG - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	26	59%	59%	-
	>=0.05	32	44%	29%	58,8
CYP1B1	<1	20	48%	48%	59,6
	>=1	38	50%	34%	58,8
ALDH1	<0.01	27	47%	47%	52,3
	>=0.01	31	51%	37%	60,5
ALDH2	<0.92	29	52%	52%	-
	>=0.92	29	46%	30%	58,8

Tabela 19 – Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida global para cada marcador, sem distinção de grupo

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	50	1	1	1	0,999
	>=0.05	49	1,00	0,59	1,69	
CYP1B1	<1	50	1	1	1	0,432
	>=1	49	0,81	0,48	1,37	
ALDH1	<0.01	50	1	1	1	0,213
	>=0.01	49	0,72	0,42	1,21	
ALDH2	<0.92	49	1	1	1	0,751
	>=0.92	50	1,09	0,64	1,85	

Tabela 20 – Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida global para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	24	1	1	1	0,140
	>=0.05	17	0,55	0,24	1,23	
CYP1B1	<1	30	1	1	1	0,403
	>=1	11	0,66	0,24	1,78	
ALDH1	<0.01	23	1	1	1	0,082
	>=0.01	18	0,48	0,21	1,12	
ALDH2	<0.92	20	1	1	1	0,167
	>=0.92	21	0,56	0,25	1,28	

Tabela 21– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida global para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	26	1	1	1	0,138
	>=0.05	32	1,76	0,82	3,78	
CYP1B1	<1	20	1	1	1	0,726
	>=1	38	1,14	0,53	2,45	
ALDH1	<0.01	27	1	1	1	0,880
	>=0.01	31	1,06	0,51	2,19	
ALDH2	<0.92	29	1	1	1	0,236
	>=0.92	29	1,55	0,75	3,22	

### APÊNDICE C – Tabelas de análise de sobrevida doença específica

Tabela 22 – Análise das taxas de sobrevida doença específica (SDE) para cada marcador, sem distinção de grupo

Marcador	Categoria	n	SDE - 5 anos	SDE - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	50	54%	50%	62,3
	>=0.05	49	52%	32%	68,4
CYP1B1	<1	50	47%	35%	46,3
	>=1	49	59%	45%	80,7
ALDH1	<0.01	50	51%	36%	62,3
	>=0.01	49	56%	45%	80,7
ALDH2	<0.92	49	55%	50%	-
	>=0.92	50	51%	35%	68,4

Tabela 23 – Análise das taxas de sobrevida doença específica (SDE) para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	SDE - 5 anos	SDE - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	24	37%	29%	20,9
	>=0.05	17	67%	22%	68,4
CYP1B1	<1	30	44%	23%	27,6
	>=1	11	61%	61%	-
ALDH1	<0.01	23	41%	16%	27,6
	>=0.01	18	59%	59%	-
ALDH2	<0.92	20	41%	31%	20,9
	>=0.92	21	56%	33%	68,4

Tabela 24 – Análise das taxas de sobrevida doença específica (SDE) para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	categoria	n	SCE - 5 anos	SCE - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	26	70%	70%	-
	>=0.05	32	45%	33%	58,8
CYP1B1	<1	20	51%	51%	-
	>=1	38	58%	44%	80,7
ALDH1	<0.01	27	58%	58%	-
	>=0.01	31	55%	43%	68,8
ALDH2	<0.92	29	63%	63%	-
	>=0.92	29	48%	35%	58,8

Tabela 25– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida doença específica para cada marcador, sem distição de grupo

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	50	1	1	1	0,9455
	>=0.05	49	1,02	0,58	1,80	
CYP1B1	<1	50	1	1	1	0,2397
	>=1	49	0,71	0,40	1,26	
ALDH1	<0.01	50	1	1	1	0,2324
	>=0.01	49	0,71	0,40	1,25	
ALDH2	<0.92	49	1	1	1	0,4926
	>=0.92	50	1,22	0,69	2,17	

Tabela 26– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida doença específica para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	24	1	1	1	0,0823
	>=0.05	17	0,46	0,19	1,13	
CYP1B1	<1	30	1	1	1	0,3378
	>=1	11	0,59	0,20	1,77	
ALDH1	<0.01	23	1	1	1	0,1066
	>=0.01	18	0,48	0,20	1,19	
ALDH2	<0.92	20	1	1	1	0,2525
	>=0.92	21	0,60	0,25	1,45	

Tabela 27– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida doença específica para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	26	1	1	1	0,0618
	>=0.05	32	2,25	0,94	5,40	
CYP1B1	<1	20	1	1	1	0,9782
	>=1	38	1,01	0,45	2,30	
ALDH1	<0.01	27	1	1	1	0,8957
	>=0.01	31	1,05	0,48	2,33	
ALDH2	<0.92	29	1	1	1	0,1325
	>=0.92	29	1,86	0,82	4,20	

**APÊNDICE D – Tabelas de análise de sobrevida livre de recidiva**

Tabela 28 – Análise das taxas de sobrevida livre de recidiva (SLR) para cada marcador, sem distinção de grupo

Marcador	Categoria	n	SLR - 5 anos	SLR - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	42	42%	42%	36,3
	>=0.05	32	46%	38%	40,3
CYP1B1	<1	39	25%	25%	18,6
	>=1	35	64%	57%	-
ALDH1	<0.01	41	31%	31%	19,0
	>=0.01	33	59%	53%	-
ALDH2	<0.92	44	45%	45%	37,6
	>=0.92	30	42%	34%	36,3

Tabela 29 – Análise das taxas de sobrevida livre de recidiva (SLR) para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	SLR - 5 anos	SLR - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	22	33%	33%	17,9
	>=0.05	17	42%	42%	40,3
CYP1B1	<1	29	29%	29%	17,9
	>=1	10	60%	60%	-
ALDH1	<0.01	22	20%	20%	13,4
	>=0.01	17	58%	58%	-
ALDH2	<0.92	20	35%	35%	17,9
	>=0.92	19	36%	36%	35,5

Tabela 30 – Análise das taxas de sobrevida livre de recidiva (SLR) para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	Categoria	n	SLR - 5 anos	SLR - 10 anos	Mediana
CYP1A1	<0.05	20	53%	53%	-
	>=0.05	15	50%	38%	45,6
CYP1B1	<1	10	14%	14%	29,2
	>=1	25	66%	57%	-
ALDH1	<0.01	19	43%	43%	42,2
	>=0.01	16	62%	50%	62,0
ALDH2	<0.92	24	51%	51%	-
	>=0.92	11	52%	35%	62,0

Tabela 31– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida livre de doença para cada marcador, sem distinção de grupo

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	42	1			0,786
	>=0.05	32	0,92	0,49	1,73	
CYP1B1	<1	39	1			<b>0,008</b>
	>=1	35	0,42	0,21	0,81	
ALDH1	<0.01	41	1			<b>0,039</b>
	>=0.01	33	0,50	0,26	0,98	
ALDH2	<0.92	44	1			0,947
	>=0.92	30	1,02	0,54	1,93	

Tabela 32– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida livre de doença para cada marcador, considerando o grupo teste

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	22	1	1	1	0,2957
	>=0.05	17	0,64	0,28	1,49	
CYP1B1	<1	29	1	1	1	0,2018
	>=1	10	0,50	0,17	1,48	
ALDH1	<0.01	22	1	1	1	<b>0,0417</b>
	>=0.01	17	0,41	0,17	0,99	
ALDH2	<0.92	20	1	1	1	0,4949
	>=0.92	19	0,75	0,33	1,71	

Tabela 33– Análise dos riscos relativos (RR) a sobrevida livre de doença para cada marcador, considerando o grupo controle

Marcador	Categoria	n	RR	IC(95%)		p
CYP1A1	<0.05	20	1	1	1	0,4792
	>=0.05	15	1,42	0,53	3,82	
CYP1B1	<1	10	1	1	1	<b>0,0305</b>
	>=1	25	0,35	0,13	0,95	
ALDH1	<0.01	19	1	1	1	0,4134
	>=0.01	16	0,66	0,24	1,81	
ALDH2	<0.92	24	1	1	1	0,7225
	>=0.92	11	1,20	0,44	3,31	

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressão proteica das enzimas metabolizadoras de drogas no carcinoma epidermoide de boca em pacientes jovens.

**Pesquisador:** Adriana Rocha de Caris

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 12393213.5.0000.0077

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 208.406

**Data da Relatoria:** 19/02/2013

#### Apresentação do Projeto:

Análise de prontuários médicos. Os prontuários médicos de 300 pacientes com o diagnóstico de carcinoma epidermoide primário de boca, tratado no período de 1990 a 2007 serão retrospectivamente revisados. Destes serão selecionados 120 prontuários, 40 de grupo teste, composto por espécimes biopsiados antes do tratamento ou peças cirúrgicas de pacientes que não tenham recebido tratamento prévio. Pacientes com idade menor ou igual a 40 anos; e 80 como grupo de controle, composto por espécimes biopsiados antes do tratamento ou peças cirúrgicas de pacientes que não tenham recebido tratamento prévio. Pacientes com idade acima de 50 anos.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar a expressão proteica da CYP1A1, CYP1B1, ALDH-1 e ALDH-2 através da técnica de microarranjo (Tissue Microarray)

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos. Sobre os benefícios, se diferenças entre os grupos existirem, observar-se-á que diferentes estratégias de tratamento para pacientes jovens em relação aos mais idosos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Consta que a instituição co-participante é a Fundação Antônio Prudente- Hospital do Câncer A. C. Camargo, e consta que os prontuários são do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



Otorrinolaringologia do referido Hospital.

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

Não há TCLE, pois serão examinados apenas prontuários de pacientes já falecidos.

**Recomendações:**

-

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

-

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado de acordo com o parecer emitido aprova o projeto

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Fevereiro de 2013

---

Assinador por:  
**JANETE DIAS ALMEIDA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av.Engº Francisco José Longo 777

**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000

**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

**Telefone:** (12-)3947-9078 **Fax:** (12-)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br