LUCIANA SASSA MAROCCHIO

Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE))

São Paulo

2010

LUCIANA SASSA MAROCCHIO

Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia ou Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Suzana C. O. M. de Sousa

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Marocchio, Luciana Sassa

Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE) / Luciana Sassa Marocchio; orientador Suzana C. O. M. de Sousa. -- São Paulo, 2010.

68p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma de células escamosas – Receptores hormonais – Análise. 2. Carcinoma de células escamosas – Aromatase – Análise. 3. Patologia Bucal. I. Sousa, Suzana C. O. M. de. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marocchio LS. Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE). Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

A Deus...por ter guiado e abençoado meus passos através de toda a jornada da vida. Permitindo que eu chegasse até aqui... Demonstrando Sua presença iluminada a cada momento... aumentando minha fé e me mostrando que Seus planos são sempre perfeitos.

Aos meus pais...Alberto e Geanete...Exemplos de vida. Só posso agradecer por tantas oportunidades que me concederam, pelo apoio incondicional a cada nova decisão, pelas lágrimas e risos companheiros e por me fazer crer que eu sempre posso alcançar meus objetivos...mesmo quando eu duvido disso! Amo vocês!

"Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar." (Bertrand Russell)

DEDICATÓRIAS

Ao meu irmão Guilherme...obrigada por ser o melhor amigo que eu poderia ter, por me inspirar, ouvir e iluminar meus dias com esse sorriso tão jovem!

A minha avozinha Cecília...pelo exemplo de vida.....pela força constante....pela fé inabalável de que tudo sempre dará certo para nós e pelas muitas orações!

Ao meu amigo, melhor amigo, namorado e marido (em ordem cronológica) Antonio Kawagoe dos Santos... pela sua presença constante em minha vida....me ensinando outro ritmo de vida, outras formas de sentir os acontecimentos, me encorajando a tomar grandes decisões. Pelo Amor que jamais cerceia....mas que faz crescer. A você também todo o meu amor!

A “minha” família Kawagoe....pessoas especiais que sempre estiveram torcendo por mim

A minha querida orientadora da graduação: Profa Dra Renata Callestini Felipini... Por suas mãos tudo começou....Obrigada pela paciência, amizade, carinho, presença constante, ensinamentos e confiança. Agradeço pelo exemplo, pela amizade e pela minha iniciação científica....sempre!

A minha querida orientadora do mestrado: Profa Dra Denise Tostes de Oliveira...Agradeço pela acolhida inicial...quando eu era uma recém-formada e por todo caminho que percorremos juntas...do período do mestrado até hoje. Seus ensinamentos e palavras de incentivo ecoam constantemente em minha mente e em meu coração...me ajudando a seguir em frente!

"Se eu vi mais longe, foi por estar em pé sobre ombros de gigantes."
[Isaac Newton]

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Profa Dra Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa... Agradeço a acolhida inicial, a confiança, a compreensão, a paciência e todos os ensinamentos... Profissionais e pessoais! Meus sinceros agradecimentos e minha admiração!

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior...Agradeço pela oportunidade concedida de trabalhar em seu laboratório, o que me proporcionou um aprendizado que jamais imaginei! Agradeço também pelos conhecimentos transmitidos e pelas inúmeras fotomicrografias que fez para mim!

A Profa Dra Cristiane de Miranda França... por ter me aberto as primeiras portas da docência... pela confiança depositada em mim.... pelo incentivo e amizade!

A Profa Dra Luciana Corrêa... Agradeço pela acolhida inicial... pelas parcerias.... pelos ensinamentos... pela boa vontade, paciência e principalmente pela amizade!

Ao Prof Dr Alberto Consolaro...Pelas valiosas tardes de estudo da rotina do laboratório de Patologia Cirúrgica na FOB... contribuindo enormemente para minha formação de Patologista Bucal.

Aos meus queridos amigos....

Fernanda Salgueiredo Giudice...não tenho palavras para agradecer... a disponibilidade, a doação, a boa vontade, o caráter, a honestidade....Fê....tudo isso é possível hoje, por que você pode me ajudar! Ah...e pelo Natal que quase passamos fazendo Western Blotting!

Camila de Oliveira Rodini... pelo seu incentivo decidi começar o doutorado.... pelo seu apoio descobri que havia um lugar na FO para mim!

Alexandra Fontes da Costa... minha primeira amiga na FO! Pelas conversas... risadas... sonhos partilhados....pela amizade!

Fátima e Ulrich Klingbeil.... uma família muito especial! Pelas nossas risadas...choros.... e conquistas!

Márcia Campos.... pela amizade, doçura e apoio! Sinto saudades!

Joelma Lima... pela oportunidade de trabalharmos juntas...pela confiança que você deposita em mim...sempre!

Felipe Fornias Sperandio... pela amizade e apoio em qualquer hora!

Paulo Brás... pela amizade, alegria e otimismo sempre compartilhados!

Renata Falchete do Prado... minha irmã de coração!

Danieli Colaço Siqueira, Danilo Furquim Siqueira, Renato Moraes, Marta Miyasawa, Amélio Borges Taveira, André Carolli Rocha e Maurício Duarte da Conceição...amigos de longa data...nem sempre tão perto quanto eu gostaria....mas sei que estão sempre torcendo por mim!

"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há também aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol." (Pablo Picasso)

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, através de sua Diretoria, Funcionários e Docentes que propiciaram condições para a conclusão desse projeto.

Aos professores do Departamento de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia da USP- Fo: Profa Dra Marina Magalhães, Profa Dra Marília Trierveiler Martins, Profa Dra Andrea Mantesso, Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes e Profa Dra Karem Lopez Ortega... Meu muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável.

Aos amigos de pós graduação que contribuíram, cada um de seu jeito, para esse trabalho...e também para minha vida!

Kívia Linhares Ferazzo, Helder Pontes, Flávia Caló, Katiucia Paiva, Maria Fernanda, Fernanda Amorim, Juliana Schussel, Patrícia Adachi, Fabiana Martins, Márcio, Aline Abrahão, Juliana Noguti, Brunno Silva, Fernanda Yamamoto, Érika Martins, Renata Acay, Roberto Rejas, Arthur Rodrigues (Tuti), Fábio Coracin, Karin Sá Fernandes, Ronald Orellanas, Lourdes Vanessa, Carla Dinelli Dias, Thaís Acquafreda, Tatiana Libório, Tessa Lucena, Valtuir Felix, Marco Aurélio (Magá), Mayra Vasquez, Paulo Sérgio, Aluana Dal Vecchio.

Aos funcionários do departamento de Patologia Bucal: Elisa, Bia, Adriana, Juvani, Zilda, Néia e Nair...O trabalho de vocês foi fundamental para minha formação e para a conclusão desse trabalho! Obrigada pela convivência e apoio!

Aos funcionários da Biblioteca da FO, na pessoa de Glauci, pela presteza e apoio sempre tão importantes.

A CAPES pelo auxílio pecuniário.

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano”
Isaac Newton

Marocchio LS. Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

Das diversas neoplasias denominadas câncer de boca, mais de 95% tem o diagnóstico de carcinoma epidermóide (CE). O carcinoma epidermóide apresenta etiologia e patogênese complexas e não totalmente compreendidas determinando altos índices de morbidade e mortalidade. Por isso crescentes esforços têm sido empregados para a melhor compreensão dos eventos celulares, da susceptibilidade genética e dos fatores de risco que atuando em conjunto dão origem e atuam na progressão do carcinoma epidermóide de boca. Buscando novas facetas da carcinogênese oral e baseando-se no papel pró-carcinogênico que os hormônios esteróides desempenham nas neoplasias dos órgãos reprodutivos, alguns estudos passaram a avaliar o papel desses hormônios na patogênese e progressão do CE. O propósito deste trabalho foi avaliar a presença dos receptores de androgênio, estrogênio (alfa e beta) e da enzima aromatase em carcinomas epidermóides de boca (CE), através das técnicas de imuno-histoquímica, western-blotting e imuno-fluorescência, e comparar, com base no gênero (masculino e feminino), os resultados encontrados. Da amostra de CE utilizada, 30 eram pertencentes a pacientes do gênero feminino e 30 do masculino. Para as reações de Western blotting e imunofluorescência foram utilizadas duas linhagens celulares: OSCC9 e OSCC25, derivadas de CE de língua. Nas reações imunohistoquímicas, apesar de um número maior de casos negativos do que positivos, observou-se que o receptor de estrogênio beta foi o mais expresso, seguido pelo receptor de androgênio e aromatase. O receptor de estrogênio alfa apresentou menor imunoexpressão. Houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros apenas na expressão dos receptores de androgênio. Os resultados obtidos pelo western blotting e imuno-fluorescência evidenciaram que as duas linhagens celulares utilizadas apresentaram receptores de estrogênio beta no núcleo, bem como, a presença da enzima aromatase com localização citoplasmática. Os receptores de androgênio foram observados no núcleo somente na linhagem OSCC9 enquanto que os receptores de estrogênio alfa não foram evidenciados em nenhuma das linhagens. Esses

resultados sugerem que em alguns casos de CE possa existir contribuição hormonal na progressão da doença, evidenciando a necessidade da utilização desses marcadores nesse tipo de neoplasia.

Palavras - chave: Carcinoma epidermóide. Carcinogênese. Androgênio. Estrogênio. Aromatase

.

Marocchio LS. Analysis of the expression of hormonal receptors (androgen, estrogen alpha and beta) and aromatase enzyme in oral squamous cell carcinoma (OSCC). [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the main type of oral cancer presenting complex and not completely understood pathogenesis. OSCC implies quite significant mortality and morbidity rates and in spite of the vast amount of research and the advances in the field of oncology and surgery, the overall survival remains largely unchanged. Therefore, the identification of new pathways involved in the mechanisms of carcinogenesis can bring knowledge to the control and advent of new treatments. The role of androgens and estrogens in several endocrine-related malignancies is well known. The successful use of these hormones antagonists in the treatment of these neoplasms has prompted researches to investigate the presence of hormones receptors in other tissues and tumor types. The aim of this study was to assess through immunohistochemistry, western blot and immunofluorescence assays the expression, gender-related, of androgen, estrogen alpha and beta receptors and aromatase enzyme in cases of OSCC. A total of 60 cases of OSCC (30 from males and 30 from females) were retrieved and submitted to immunohistochemical assay. Two OSCC cell lines were used for western blot and immunofluorescence techniques: OSCC-9 and OSCC-25, originated from the tongue. Immunohistochemical staining demonstrated that estrogen beta and androgen receptors and aromatase enzyme, respectively, were more frequently expressed in OSCC. Estrogen alpha receptor had the lower immuno expression. Only androgen receptors presented differences statistically significant between genders. Western blotting and immunofluorescence analysis demonstrated that estrogen beta receptor was abundantly present in nuclear region of SCC9 and SCC25 cell lines, as well as aromatase protein, although its localization was cytoplasmatic. Androgen receptor was observed in the nucleus of SCC9 cell line and absent in the SCC25 cell line. On the other hand, estrogen alpha receptor was not detected either in western blot assay or in immunofluorescence. Even though these proteins presented a variable

expression in OSCC, it is interesting to conduct more studies about them, since we could have more possibilities to predict and control oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Oral squamous cell cancer. Carcinogenesis. Androgen. Estrogen. Aromatase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Imuno-histoquímica: (A, B= 40x) Expressão nuclear da proteína de RA em CE e controle(10x); (C=2.5x, D=40x) Expressão citoplasmática da proteína da Aro em CE e controle (10x); (E=2,5x, F=40x) Expressão nuclear da proteína de RE β em CE e controle(10x); (G=2.5x, H=40x) Expressão nuclear do RE α em CE e controle (10x)48
- Figura 5.2 - Western blotting: Expressão das proteínas de RA, Aro, RE β , RE α e β -actina nas linhagens celulares de CE (OSCC9 e OSCC25) e nos seus respectivos controles.....50
- Figura 5.3 - Imuno-fluorescência: (A=40x) Expressão nuclear da proteína de RA na OSCC9; (B=40x) Ausência de expressão da proteína de RA na OSCC25 - DAPI; (C, D=40x) Expressão citoplasmática da proteína da Aro nas OSCC9 e OSCC25 (E, F=40x) Ausência de expressão da proteína de RE α nas OSCC9 e OSCC25 - DAPI; (G, H=10x) Expressão nuclear da proteína de RE β nas OSCC9 e OSCC25;51

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Especificações técnicas dos anticorpos utilizados na Imuno-histoquímica	34
Tabela 4.2	Especificações técnicas das linhagens celulares utilizadas	35
Tabela 4.3	Composições dos géis de acrilamida com SDS (10X16 cm) utilizados no Western Blotting	37
Tabela 4.4	Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no Western Blotting ...	38
Tabela 4.5	Especificações técnicas dos anticorpos utilizados na Imunofluorescência	39
Tabela 5.1	Distribuição de frequência dos pacientes do gênero feminino e masculino com carcinoma epidermóide oral segundo os dados demográficos. Faculdade de Odontologia de São Paulo/USP	41
Tabela 5.2	Frequência de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para cada anticorpo utilizado, sem distinção entre os sexos	43
Tabela 5.3	Frequência de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para cada anticorpo utilizado, segundo o sexo	44
Tabela 5.4	Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação ao tamanho da lesão.....	44
Tabela 5.5	Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação ao tamanho da lesão	45
Tabela 5.6	Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação à idade	45

Tabela 5.7	Freqüência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação à idade.....	46
Tabela 5.8	Freqüência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação à duração da lesão.....	46
Tabela 5.9	Freqüência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação à duração da lesão	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitro
bcl2	B cell lymphoma 2
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	DNA complementar
CE	Carcinoma Epidermóide
CO ₂	dióxido de carbono
Cox 2	Ciclooxigenase 2
DAB	3,3 diaminobenzidina
DMEM	Meio de eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
erb-2	Her/neu – Human epidermal growth factor 2
et al	e colaboradores
HE	hematoxilixa e eosina
HLA	Human leucocyte antigen (MHC)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	quilodaltons
ki-67	Proteína nuclear expressa em células em proliferação
LNCaP	Linhagem celular derivada de adenoma carcinoma prostático humano sensíveis ao androgênio
mA	miliampere
MCF-7	Linhagem celular derivada de câncer de mama positiva para receptor de estrogênio alfa
MDA	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama positiva para receptor de estrogênio beta
mM	mili-molar
mm	milímetro
MMP-2	metaloproteinase 2
MMP-9	metaloproteinase 9
NaCl	cloreto de sódio
NFκ-beta	Fator nuclear NF kappa B
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde

p16	gene p16
p53	gene p53
PBS	phosphate-buffered saline
pH	potencial hidrogeniônico
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
REa	Receptor de estrogênio alfa
REb	Receptor de estrogênio beta
RA	Recptor de androgênio
RMAm	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
SDS	dimetil sulfóxido
SDS-Page	sulfato dodecil sódico
SFB	soro fetal bovino
TBST	Tris- buffered saline tween 20
Tris - HCl	tris-hydroximetil-aminometano ácido clorídrico
Tris-EDTA	tris-hydroximetil-aminometano EDTA
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
V	Volts
w	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa – primeira letra do alfabeto grego
β	beta – segunda letra do alfabeto grego
%	Porcento
<	Menor
°C	graus Celsius
χ^2	qui-quadrado
x	número de vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Carcinoma Epidermóide	22
2.2 Hormônios: Androgênio e Estrogênio: seus receptores e a enzima Aromatase..	27
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer de boca refere-se a um subgrupo de neoplasias malignas de cabeça e pescoço que se desenvolve no lábio, língua, glândulas salivares, gengiva, assoalho bucal, mucosa jugal, orofaringe e qualquer outra área intra-bucal (Classificação internacional das doenças ICD versão 9, categorias 140, 146-149). De acordo com Organização Mundial da Saúde (Barnes et al., 2005), o câncer de boca apresenta a oitava maior incidência no mundo, índice que pode sofrer variações de acordo com o espaço geográfico (Parkin et al., 2005; Marocchio et al., 2010). Das diversas neoplasias denominadas câncer de boca, mais de 95% tem o diagnóstico de carcinoma epidermóide (CE). O CE ocorre, de forma geral, em adultos entre a quinta e a sexta décadas de vida, com predileção pelo gênero masculino (Silverman, 2001; Barnes et al.; 2005, Marocchio et al., 2010).

Estima-se que sejam diagnosticados aproximadamente 350.000 novos casos de CE de boca em todo o mundo (Sturgis et al., 2004) e em média metade desses pacientes morrem em um período de cinco anos. Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais, acarretando diretamente na diminuição da qualidade de vida (Sidranski, 1995).

Apesar das grandes e variadas pesquisas na área da oncologia e cirurgia, os índices de mortalidade não diminuem (Silverman 2001, Massano et al., 2006).

Embora se suponha que haja relação entre os eventos que levam ao desenvolvimento embrionário normal dos tecidos e o surgimento da neoplasia durante a vida (Cunha et al., 2004), ainda não existe a compreensão necessária do processo da carcinogênese oral que possibilite o controle dessa doença, principalmente pela sua etiologia multifatorial e complexa patogênese (Tabor et al., 2001).

Dessa forma, crescentes esforços têm sido empregados para a melhor compreensão dos eventos celulares, da susceptibilidade genética e dos fatores de risco que atuando em conjunto dão origem e atuam na progressão do carcinoma epidermóide de boca.

Baseando-se no fato de que os hormônios esteróides são reconhecidamente

importantes fatores pró-carcinogênicos nas neoplasias de mama, próstata, útero e endométrio (Brinkman; 2001; Ikeda; Inoue, 2004; Cunat et al., 2004; Carruba, 2007; Czajica-oraniec; Simpson 2010), alguns estudos passaram a avaliar o papel dos hormônios esteroidais na patogênese e progressão do CE, buscando novas facetas da carcinogênese oral. Pesquisas atuais têm observado, através de técnicas imuno-histoquímicas, de estudos *in vitro* e de biologia celular e molecular, a expressão de receptores hormonais e da enzima aromatase em queratinócitos e CE de mucosa bucal (Molteni et al., 1981; Nehse; Tunn, 1994; Cheng et al., 2006; Dos Santos et al., 2004; Ishida et al., 2007; Nelson et al., 2007; Ku; Crowe, 2007), sugerindo que o mecanismo de proliferação e invasão tecidual dos CEs de boca também possa apresentar uma via hormônio-dependente.

Dessa forma, a proposição deste trabalho foi avaliar a presença dos receptores de androgênio (RA), estrogênio (RE α e RE β) e da enzima aromatase (Aro) em carcinomas epidermóides de boca (CE), com base no gênero (masculino e feminino) por intermédio das técnicas de imuno-histoquímica e western-blot e imuno-fluorescência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide

De acordo com Organização Mundial da Saúde (Barnes et al., 2005), o câncer de boca apresenta a oitava maior incidência no mundo, índice que pode sofrer variações de acordo com o espaço geográfico (Barnes et al., 2005). No Brasil, o câncer de boca é o oitavo em incidência (INCA) (28/04/2010 12:22hs). Para 2010, a estimativa de novos casos de câncer de boca por 100000 habitantes em homens foi de 10330 e em mulheres 3790. No estado de São Paulo essa estimativa é de 3230 para homens e de 890 para mulheres (por 100000 hab) (INCA).

Das diversas neoplasias epiteliais malignas em boca, mais de 95% tem o diagnóstico de carcinoma epidermóide. Nos países em desenvolvimento, quando se considera apenas a população masculina, o CE é a sexta neoplasia mais encontrada após as de pulmão, próstata, colorretal, estômago e bexiga. Enquanto na população feminina fica em décimo lugar vindo após o câncer de mama, colorretal, pulmão, estômago, útero, cérvix, ovário, bexiga e fígado. Estima-se que haja um aumento na taxa de incidência mundial dessa neoplasia nas próximas décadas (Landis et al., 1999).

Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 350.000 novos casos de CE de boca em todo o mundo (Sturgis et al., 2004). Em média metade desses pacientes morrem em um período de cinco anos. Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais, acarretando diretamente na diminuição da qualidade de vida (Sidranski, 1995).

O CE é uma neoplasia epitelial maligna invasiva com potencial para metástases locais e regionais (Tabor et al., 2001; Barnes et al., 2005). Ocorre de forma geral, em adultos entre quinta e sexta décadas de vida, com predileção pelo gênero masculino (Silverman, 2001; Barnes et al., 2005; Scully; Bagan, 2009; Marocchio et al., 2010). Os tumores podem surgir em qualquer local da cavidade bucal. Entretanto, dois terços anteriores da língua, soalho bucal, palato duro, mucosa bucal e gengiva superior e inferior podem ser considerados locais de risco.

A incidência nesses locais pode ser variável. Observa-se, no entanto, que essa variável relaciona-se com a localização geográfica da população em estudo, refletindo as diferentes raças e, por conseguinte, hábitos e fatores de risco diferentes. (Silverman, 2001; Barnes et al., 2005; Parkin et al., 2005; Marocchio et al., 2010).

O queratinócito oral origina o CE através de mutação genética espontânea ou estimulada por algum fator externo químico ou físico. Os mais comumente citados são: consumo de álcool, hábito de fumar e exposição solar. O efeito carcinogênico sinérgico do consumo concomitante do cigarro e álcool é sempre colocado em evidência. (Silverman 2001, Barnes et al., 2005; Massano et al., 2006; Bagan e Scully; 2008; Scully ; Bagan 2009). Considera-se também que esses agentes aumentem a taxa de proliferação de queratinócitos já alterados geneticamente (Scully; Bagan, 2009).

Embora alguns desses agentes sejam reconhecidamente importantes na patogênese do CE, existe uma clara disparidade entre o número de pessoas que desenvolvem o tumor e o número de pessoas expostas a esses fatores. Essa susceptibilidade individual tem sido atribuída aos diferentes polimorfismos genéticos que poderiam determinar as diferenças no metabolismo da carcinogênese, no reparo do DNA e outros mecanismos protetores (Massano et al., 2006; Bagan ; Scully 2008, Scully; Bagan, 2009).

Outros fatores associados ao aumento da taxa de proliferação dos queratinócitos neoplásicos são: hábitos alimentares, hábito de mascar tabaco e estado imunológico do paciente. Alguns vírus, particularmente alguns subtipos de papiloma vírus humano (HPV), também têm sido associados a tumorigênese do CE, principalmente os de orofaringe (Massano et al., 2006; Bagan ; Scully 2008, Scully; Bagan, 2009;). O estado de saúde bucal também é considerado um fator de risco, especula-se que a interação mutagênica das bactérias da placa supra gengival com a saliva e com outras bactérias como os *Streptococcus* e *Neisseria* metabolizariam o acetaldeído - metabólito da oxidação do álcool- considerado carcinogênico. (Bagan ; Scully, 2008, Scully; Bagan, 2009)

Estima-se que para o carcinoma bucal as células devam experimentar 6- 10 mutações antes de tornarem-se malignas, podendo ser necessários anos de exposição aos carcinógenos para ocorrer uma combinação de mutações específicas

que culminará na transformação maligna (Costea et al., 2006).

Atualmente mudanças em mais de cem genes têm sido relacionadas à patogênese do CE (Tabor et al., 2001; Roepman et al., 2005; Bagan ; Scully 2008, Scully; Bagan, 2009). Alguns estudos têm demonstrado a expressão de características aberrantes de HLA nas células neoplásicas, bem como deleções cromossômicas específicas, principalmente em regiões que contêm alguns genes supressores de tumor. Genes, chamados “genes chaves” também são relacionados à carcinogênese, principalmente os supressores de tumor, e os oncogenes, tais como: inibidores das ciclinas, p 53, p16, retinoblastoma RB1, ciclinas, fatores de crescimento epidermal, ras oncogene e metaloproteinases (Tabor et al., 2001; Massano et al., 2006; Bagan ; Scully 2008, Scully; Bagan, 2009).

Os aspectos clínicos do CE não são patognomônicos. Segundo BARNES et al (2005) as lesões pequenas costumam ser assintomáticas. Sendo que o diagnóstico diferencial deve basear-se principalmente nos hábitos de vida. No momento do diagnóstico a maioria dos pacientes já se apresenta com lesões maiores e queixa de sintomatologia dolorosa, o que indica que a doença já está localmente avançada.

Tal qual no epitélio oral, no CE são esperados três tipos celulares:

- 1 – células-tronco, com divisões infreqüentes, porém com grande capacidade de se renovar e de gerar diversas populações fenotípicas de células tumorais;
- 2- células amplificadas, que possuem capacidade limitada de proliferação, porém podem amplificar a população de células maduras dividindo-se várias vezes;
- 3- células diferenciadas (Costea et al., 2006)

A camada basal é tida como a localização anatômica de células-tronco/específicas progenitoras do tecido epitelial (Tudor et al., 2004). Têm sido descritas como maior alvo de mutações que podem levar ao câncer. Essas mutações são consideradas de alto risco tanto para a transformação maligna, quanto para a progressão tumoral (Costea et al., 2006). A longevidade das células-tronco faz com que sejam mais susceptíveis acumulem danos genéticos durante a renovação celular e se tornem alvos para a transformação carcinogênica (Clarke,

2003). Portanto tendo sua capacidade de renovação constante, as células-tronco já mutadas transferem o material genético alterado para as células filhas, as quais podem ficar imortais e originar neoplasias (Martinez-Climent et al., 2006). Outro aspecto importante é que se acredita que as células-tronco tumorigênicas percam o mecanismo autorregulatório do crescimento normal, no qual há limitação de sua proliferação; fazendo com que haja uma proliferação descontrolada dessas células mutadas. (Reya et al., 2001)

A imortalização e os passos da transformação maligna podem ocorrer durante a amplificação ou diferenciação das células-tronco e isso pode explicar porque em muitos tumores as células adquirem característica de diferenciação (Clarke, 2003). Além disso, as células-tronco tumorais podem ter um importante papel na heterogeneidade do tumor, na invasão metastática (Reya et al., 2001) e podem ser responsáveis pela recorrência local ou distante anos após o tratamento do tumor primário (Dontu et al., 2003).

Histologicamente, o CE apresenta padrão de crescimento invasivo, exibindo rompimento da membrana basal. As células epidermóides neoplásicas proliferam-se em ninhos, cordões e lençóis por todo o estroma tecidual, podendo invadir vasos sanguíneos e linfáticos, bem como, feixes nervosos. Individualmente, essas células apresentam pleomorfismo, hipercromatismo e atividade mitótica. As figuras de mitoses podem apresentar-se típicas ou bizarras. Em grau variável observa-se também queratinização individual com a formação de pérolas de queratina (Barnes et al., 2005).

A população celular dos CEs é heterogênea (Tremmel et al., 2003; Prince et al., 2007). A heterogeneidade é principalmente atribuída ao processo de expansão clonal, na qual vários clones são continuamente gerados devido às mudanças genéticas. Supõe-se que a maioria das células neoplásicas tenha capacidade limitada de se dividir e somente um pequeno grupo de células distintas fenotipicamente, as células-tronco cancerígenas, apresentem a capacidade de proliferar e formar novos tumores (Tabor et al., 2001; Reya et al., 2001; Prince et al., 2007).

Os CEs são classificados de acordo com as suas características histológicas em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Pode-se dizer que quanto maior a semelhança histológica do tumor com o tecido de

origem normal, mais diferenciada ela será, associando-se a isso um melhor prognóstico (Barnes et al., 2005).

Os marcadores biológicos têm importância no diagnóstico histopatológico, como fatores preditivos do comportamento clínico. Os mais comumente usados para o diagnóstico e gradação dos carcinomas epidermóides são as citoqueratinas e vimentina (Barnes et al., 2005). No entanto, diversos outros tipos de imunomarcadores têm sido utilizados para a compreensão da sua patogênese e para o estabelecimento de fatores prognósticos, como por exemplo: anti-p53, anti-Ki-67, anti-bcl-2, anti-FAS, anti-erb-2, anti-beta catenina, anti-e-caderina (Aguiar et al, 2007), anti- NF-kappab, anti- Cox-2, anti-MMP-2 e anti- MMP-9(Bagan ; Scully 2008, Scully; Bagan, 2009).

A expressão de alguns receptores celulares importantes em outros tipos de neoplasias também têm sido estudadas nesses tumores, principalmente com o intuito do estabelecimento de novos fatores prognósticos e novas estratégias terapêuticas. Entre eles, podemos citar os receptores hormonais para estrogênio, androgênio, progesterona e aromatase, bem como, o efeito desses hormônios em cultura celulares de CEs (Molteni et al., 1981; Nehse; Tunn, 1994; Cheng et al., 2006; Dos Santos et al., 2004; Ishida et al., 2007; Nelson et al.,2007; Ku; Crowe, 2007).

Apesar das grandes e variadas pesquisas na área da oncologia e cirurgia, os índices de mortalidade relacionados ao CE não diminuem (Massano et al., 2006) e a taxa de sobrevivência mantém-se baixa (50%) quando comparada ao progresso no diagnóstico e tratamento de outros tumores (Landis et al., 1999).

2.2 Hormônios: androgênio e estrogênio: seus receptores e a enzima aromatase

É interessante a observação de que no ranking das neoplasias mais frequentes estão as de próstata, em homens, e de mama, em mulheres. Essa constatação sugere que esses órgãos, cuja embriogênese e homeostase são mantidas por hormônios esteróides, estão mais sujeitos ao processo da carcinogênese (Imagawa et al., 2002; Cunha et al., 2004; Rocheford, 2006)

Desde 1896, quando George Beatson observou que mulheres portadoras de tumores de mama e submetidas à ovariectomia apresentavam redução do tumor (Cunha et al., 2004), iniciaram-se os estudos para avaliar o papel desempenhado pelos hormônios na carcinogênese. Com a observação de Beatson, o hormônio que passou a ser alvo das pesquisas foi o estrogênio e o modelo de carcinogênese hormonal que se tornou mais detalhado e compreendido foi o de mama, o que possibilitou o surgimento de importantes marcadores prognósticos e o estabelecimento de terapias anti-hormonais (Jordan et al., 2007).

A partir de então, buscou-se compreender o mecanismo pelo qual o estrogênio e outros hormônios esteróides poderiam atuar nas vias da carcinogênese.

Tanto o androgênio, quanto o estrogênio são hormônios derivados do metabolismo do colesterol e devido a sua estrutura são chamados de esteroidais. Por apresentarem lipofília são capazes de atravessar a membrana plasmática e se ligar aos seus receptores, localizados no núcleo celular. A teoria clássica do modo de ação dos hormônios postulou que a ligação hormônio-receptor induz a formação de um complexo que se liga a cromatina e inicia a transcrição do DNA (Mangesldorf, 1995).

Androgênio é o termo genérico utilizado para designar os hormônios esteróides responsáveis pela expressão do fenótipo masculino. Esses hormônios desempenham funções importantes durante a diferenciação sexual masculina, durante o desenvolvimento e manutenção das características masculinas secundárias e durante a iniciação e manutenção da espermatogênese (Brinkmann, 2001)

A ação do androgênio é mediada através do receptor do androgênio (RA) que pertence à superfamília dos receptores nucleares. Até hoje apenas um tipo de cDNA para receptor de androgênio foi identificado (Brinkmann, 2001).

O gene do receptor do androgênio é localizado no cromossomo X na posição Xq11—12 e codifica uma proteína com peso molecular de aproximadamente 110 kDa. O gene apresenta-se constituído por oito exons codificadores e sua organização estrutural é semelhante aos outros genes que codificam os hormônios esteroidais deferentes (Brinkmann, 2001).

Atualmente sabe-se que os receptores de androgênio mutados estão diretamente relacionados ao câncer de próstata, bem como, a algumas outras doenças como a síndrome de insensibilidade pelo androgênio e atrofia muscular espinal bulbar (Brinkmann, 2001; Dos Santos et al., 94)

O mecanismo fisiológico que resulta na produção do estrogênio é a transformação do androgênio através da ação de uma enzima microssomal denominada aromatase (Murphy, 1998; Huber et al., 2002; Cheng et al., 2006; Ghosh et al., 2009). Essa reação ocorre no citoplasma celular, na membrana bilipídica do retículo endoplasmático (Ghosh et al., 2009).

A aromatase (Aro), também conhecida como P450arom e CYP19, é uma das diversas enzimas da família do citocromo P450 (CYP), responsáveis não somente pela produção e biodisponibilidade do estrogênio, como também pela sua degradação (Murphy, 1998; Huber et al., 2002; Cheng et al., 2006; Ghosh et al., 2009). Essa enzima apresenta em sua estrutura dois sítios de ligações: um deles apresentando uma molécula de ferro e o outro um sítio de ligação esteroide, no qual, o androgênio se liga para a produção do estrogênio (Murphy, 1998). Sua expressão é regulada pela presença de hormônios, como o androgênio, e pela presença de fatores teciduais específicos, como por exemplo o fator estereoidogênico 1. (Huber et al., 2002; Ghosh et al., 2009).

O gene da aromatase está localizado no braço longo do cromossomo 15 na região 21.2 com uma região codificadora de 30 kb e uma região regulatória de 93 kb (Czajica-Oraniec; Simpson, 2010; Ghosh et al., 2009). Esse gene apresenta um mecanismo regulatório complexo. A região codificadora comum apresenta nove exons que se iniciam com o II e a região regulatória contém muitos exons alternativos I_s que são alternativamente agrupados na região imediatamente acima

da região codificadora comum. Os exons variáveis estão nos RNAs mensageiros transcritos nos tecidos específicos e podem servir como uma assinatura na identificação do promotor utilizado naquele tecido. Nove exons são citados na literatura incluindo: I.1, I.2, I.3, I.4, I.5, I.6, I.7, P.II e I.f. O exon I.1 é dirigido pelo promotor I.1 e é considerado como exclusivo da placenta, enquanto o promotor II (P.II) é mais utilizado pelos ovários e testículos. Os fibroblastos da pele e a maioria do RNAm da aromatase no tecido adiposo tem o exon I.4. O exon I.7, dirigido pelo promotor I.7, que é tipicamente encontrado nas células endoteliais, é também encontrado em tecido de câncer de mama.(Cheng et al., 2006).

Quanto aos polimorfismos desse gene sabe-se que existem mais de oitenta, sendo a maioria de um único nucleotídeo; esses polimorfismos não apresentam necessariamente relação com alterações patológicas. No entanto, sugere-se que o polimorfismo encontrado no íntron IV, um microsatélite (TTTA) repetido na posição 77 e outro (TCT) deletado ou inserido na posição 27, possam estar associados ao câncer de mama, de próstata, de endométrio, osteoporose e endometriose. Sugerindo a participação da aromatase na patogênese de condições neoplásicas (Czajica-Oraniec; Simpson, 2010)

Como já exposto anteriormente a expressão da aromatase não é confinada apenas aos órgãos reprodutivos, existem sítios extra-gonadais que também apresentam essa enzima, entre eles podemos citar: a pele, os músculos, o cérebro e os adipócitos (Cheng et al., 2006). Acredita-se que a presença da aromatase e, por conseguinte, a produção de estrogênio local seja a maior fonte de estrogênio para os homens e para as mulheres na menopausa. Especula-se ainda que essa enzima possa agir de forma autócrina no crescimento de tumores em órgãos não reprodutivos. (Simpson, 2003; Cheng et al., 2006).

Apesar do estrogênio e androgênio serem específicos para a determinação do gênero e para as funções reprodutivas de cada gênero (Murphy,1998), os dois hormônios estão presentes em homens e mulheres, diferindo em quantidade, locais de produção (Baker ; Baumm, 2007) e função (Cheng et al., 2006; Baker; Baumm, 2007), o que faz com que a aromatase seja necessária em ambos os sexos.

Os estrogênios, hormônios esteróides responsáveis pelo fenótipo feminino, atuam no crescimento, diferenciação e funcionamento nos tecidos reprodutivos (Katzenellenbogen et al., 2000), como, por exemplo, o crescimento da glândula

mamária e do endométrio uterino durante a gravidez (Ikeda; Inoue, 2004). Também desempenham papéis importantes em órgãos não reprodutivos, como ossos, fígado, pele, músculos, cérebro e adipócitos (Katzenellenbogen et al., 2000; Bord et al., 2001; Fucks et al., 2003; Hall et al., 2004; Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007). Nesses locais o estrogênio atua em processos metabólicos tais como: ação nos vasos sanguíneos, metabolismo de lipídeos e carboidratos, mineralização óssea e junção efpiseal (Bord et al., 2001; Cheng et al., 2006).

Além disso, tem se associado a expressão local da aromatase e síntese de estrogênio ao crescimento de neoplasias benignas, como o leiomioma uterino e de neoplasias malignas como: câncer de endométrio, útero, próstata (Cunat et al., 2004; Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007; Czajica-Oraniec; Simpson, 2010) e da cavidade bucal (Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007)

O estrogênio possui dois tipos de receptores, α e β (RE α e RE β), codificados respectivamente por genes diferentes: ESR1 e ESR2, encontrados em locais cromossômicos diferentes (Bord et al., 2001; Carruba, 2007). Ambos apresentam alto grau de homologia no domínio de ligação de DNA, porém diferem consideravelmente no domínio N terminal e no domínio E. Essas diferenças sugerem que esses dois receptores apresentem funções distintas para as respostas biológicas e na regulação da transcrição gênica sob o comando do estradiol (Bardin et al, 2004). O modo de ação de cada receptor depende da quantidade e do nível da expressão encontrada de cada um dele nos tecidos (Bord et al., 2001; Carruba, 2007).

Acredita-se que o desequilíbrio entre a quantidade de receptores alfa e beta nos órgãos reprodutivos possa estar relacionada ao surgimento de neoplasias (Fixemer et al., 2003, Bardini et al., 2004, Carruba, 2007).

Evidências crescentes apontam para a existência de receptores α e β , mutados em tecidos normais e patológicos, no entanto ainda não se sabe determinar o tipo dessas mutações e nem como atuam (Henrynk ; Fuqua, 2004; Carruba, 2007).

Dessa forma, questionou-se também a possibilidade da participação desses hormônios, através de seus receptores, e da aromatase, nas vias da carcinogênese em tecidos não- reprodutivos (Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe, 2007). como, por exemplo, em carcinomas epidermóides orais (CE) (Molteni et

al.,1981; Schuller et al.,1984; Nehse ; Tunn, 1994; Dos Santos et al., 2004 ; Cheng et al., 2006; Nelson et al., 2007; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe, 2007,).

Pesquisas atuais tem evidenciado, através de técnicas imunoistoquímicas, de estudos in vitro e de biologia molecular, a expressão de receptores de estrogênio e da aromatase em queratinócitos e CE de mucosa bucal (Cheng et al., 2006; Nelson et al., 2007; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe, 2007) constatando também a proliferação celular de carcinomas epidermóides de laringe, cérvix e de boca sob estímulo de estrogênio (Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007; Ku, Crowe, 2007). Outros observaram que em células de carcinomas epidermóides de boca a presença de medicamentos inibidores da ligação estrogênio-receptor de estrogênio estimulam a apoptose através de modificações no citoesqueleto dessas células (Ishida et al., 2007, Kim et al., 2007, Nelson et al., 2007). Este fato sugere que o mecanismo de proliferação e invasão tecidual dos CEs de boca também possa apresentar uma via hormônio-dependente e que, dessa forma, terapias hormonais poderiam ser utilizadas também nessas neoplasias (Ishida et al., 2007, Kim et al., 2007, Nelson et al., 2007).

3 PROPOSIÇÃO

Essa pesquisa se propõe a investigar a presença dos receptores de androgênio, e estrogênio (α e β) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca através das técnicas de imuno-histoquímica, western blotting e em imuno-fluorescência, comparando, com base na variável gênero (masculino e feminino) os resultados encontrados.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Fousp (anexo 1)

4.1 Casuística

Foram utilizados para o estudo imunoistoquímico 60 casos de CE de boca diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, armazenados em blocos de parafina no laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP.

Da amostra de CE utilizada, 30 eram pertencentes a pacientes do gênero feminino e 30 do masculino, para facilitar a comparação e associações entre os gêneros.

Para as reações de Western blot e Imuno-fluorescência foram utilizadas duas linhagens celulares: SCC9 e SCC25, derivadas de carcinoma epidermóide de língua, cultivadas no Laboratório de Patologia Celular e adquiridas de American Type Culture Collection, (Manassas, VA, USA) (Tabela 4.2)

4.2 Técnica imuno-histoquímica

A expressão dos receptores de androgênio, aromatase e estrogênio alfa e beta foram obtidas através da técnica imuno-histoquímica da Streptoavidina-biotina, conforme segue:

Cortes de 3 micrômetros foram desparafinizados pelo xilol e desidratados por uma seqüência descendente de soluções de etanóis. A recuperação antigênica foi

feita no banho Maria na solução de TRIS EDTA 10mM pH=8, durante 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol (1:1), em dois banhos de 15 minutos. Os cortes foram lavados novamente por 10 minutos em água destilada e 2 vezes em água deionizada. Logo após, foi realizado tamponamento com 3 banhos de 5 minutos em solução de Tris pH 7,4.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução tampão de TRIS-HCL pH 7,4, acrescido de albumina bovina a 1% de acordo com a tabela 4.1. Os cortes foram lavados com Tris- Hcl pH 7,6 e através do método do polímero marcado (Advance – Dako), incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos e em seguida incubados com o anticorpo terciário por 30 minutos. Foi colocado o DAB por 10 minutos e então, contra-corados com a Hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

Tabela 4.1 – Especificações técnicas dos anticorpos utilizados na Imuno-histoquímica

Soro	Tipo	Concentração	Procedência	Clones
Androgênio	monoclonal	1:25	DAKO	AR- 441
Aromatase	monoclonal	1:25	ABD -SEROTEC	H4
Estrogênio alfa	monoclonal	1:50	DAKO	1D5
Estrogênio beta	monoclonal	1:50	DAKO	EMRO2

Como controle positivo da reação imuno-histoquímica para o receptor de androgênio foi utilizado adenocarcinoma prostático* e para a enzima aromatase tecido placentário normal*. No casos dos RE α e RE β foram empregados adenocarcinomas de mama* já sabidamente positivos para cada tipo de receptor. Para o controle negativo os espécimes foram submetidos à mesma reação imuno-histoquímica com omissão do anticorpo primário.

*Gentilmente cedidos pelo Prof Dr Fernando Augusto Soares – Departamento de Patologia Geral - FOU SP

4.3 Cultura celular

Para a realização desse estudo foram utilizadas duas linhagens celulares humanas derivadas de CE, conforme especificadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Especificações técnicas das linhagens celulares utilizadas

	OSCC9	OSCC25
ORIGEM	Língua (Base)	Lingua
GÊNERO	masculino	masculino
IDADE	25 anos	70 anos

As células foram descongeladas e transferidas para frascos de cultivo. As duas linhagens foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) e HAMS F-12 (Gibco, Grand Island, NY), na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco, Grand Island, NY), 1% L-glutamina (Sigma Chemical Ca, St. Louis, MO, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Chemical Ca, St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em frascos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, o crescimento das células monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss®Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, o meio de cultura era removido, separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada, duas vezes, com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7.2, para que em seguida, as células fossem dissociadas com solução de tripsina acrescida de 0.25% EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid Tripsin EDTA solution Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA*) durante 5 min. a 37°C. As células em suspensão eram, assim, transferidas para o tubo de centrifugação, previamente reservado, e centrifugadas a 1300 rpm por 5 min., à temperatura ambiente. Essa etapa tinha por objetivo inativar, com o SFB, contido no meio de cultura, a tripsina. O sobrenadante resultante era aspirado e o precipitado de células ressuspensionado em

novo meio de cultura para que alíquotas da suspensão fossem distribuídas em frascos de cultivo e, novamente, levadas à estufa, onde cada procedimento deste dava origem a uma nova passagem celular.

De cada passagem, amostras das células eram crioprotegida com 10% de dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) e mantidas em recipiente contendo nitrogênio líquido.

4.4 Técnica de Western Blot

4.3.1 extração protéica

Após remover o meio de cultura, as placas contendo as células em 70-80% de confluência foram lavadas três vezes com PBS gelado e mantidas a 4°C. A extração protéica foi realizada com auxílio do tampão RIPA⁺ (50 mM Tris HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0.1% SDS) acrescido de 10 µL/mL de um conjunto de inibidores de protease (Chemicon, Sigma, St. Louis, MO), por 15 min. e então as placas foram raspadas e as amostras centrifugadas a 15000 rpm, por 20 min., a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -80°C, para posterior quantificação.

4.4.2 quantificação protéica

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce Chemical CO, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante. Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso (Cu^+). Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu^+ , produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro (Elisa-ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.), no comprimento de onda de 562nm, ou seja, quanto mais intensa

for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

4.4.3 Western blotting propriamente dito

As alíquotas do lisado, contendo 24 µg de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min. e submetidas à SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada a 120V durante 3 horas, em gel de bis-acrilamida com gradiente de 10-15%, dependendo da proteína analisada: para o RA utilizou-se o gel a 7,5%, para o RE α utilizou-se gel a 12,5% e para a aromatase e RE β o gel a 10%. (Tabela 4.3). O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope[®] (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA).

Tabela 4.3- Composição dos géis de acrilamida com SDS (10X16 cm) utilizados no Western Blotting

	gel de separação (40ml)			gel de empilhamento (10ml)
	7,50%	10%	12,5%	5%
água	19,4 ml	16.1 ml	12.8 ml	6.0 ml
Acrilamida/bisacrilamida	10 ml	13.3 ml	16.7 ml	1.33 ml
Separating buffer	10 ml	10 ml	10 ml	-
Stacking buffer 4x	-	-	-	2.5 ml
SDS 10%	400 µl	400 µl	400 µl	100 µl
Persulfato de amônia	200 µl	200 µl	200 µl	50 µl
Temed	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl	5 µl

A transferência das proteínas que migraram do gel para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham CO, Arlington Heights, IL, USA) foi feita por eletrotransferência úmida em aparelho especial (Höefer, mini VE, Amersham CO, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Com o tampão de transferência (48mM Tris Base; 39mM Glicina; 20% Metanol; pH 8.3) utilizado como recomendado pelo fabricante, a transferência foi feita com 70mA por 3 horas. Após essa etapa, a membrana foi submetida à fase de bloqueio. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando-se 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação.

Em seguida, o anti-soro de interesse (anti-aromatase, anti-receptor de androgênio, anti-receptor de estrogênio alfa e beta) diluído em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST foi incubado overnight em geladeira (Tabela 4.4). Após o período de incubação, foi realizada 1 lavagem de 10 minutos com TBST para remoção do anticorpo não absorvido, sob agitação e em temperatura ambiente. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi, então aplicado por 1 hora e 30 minutos e depois a membrana lavada 3 vezes com TBST por cinco minutos. A detecção colorimétrica foi feita através do kit Opti-4CN (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA), segundo instruções do fabricante. A membrana foi incubada no substrato por até 30 minutos, depois lavada em água deionizada por 15 minutos, assim pronta para documentação fotográfica. Esta reação produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse. Como controle do volume total de cada amostra foi utilizado o anticorpo β -actina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA).

Tabela 4.4 - Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no Western Blotting

Soro	Tipo	Concentração	Procedência	Clones
Androgênio	monoclonal	1:100	DAKO	AR- 441
Aromatase	monoclonal	1:100	ABD -SEROTEC	H4
Estrogênio alfa	monoclonal	1:100	DAKO	1D5
Estrogênio beta	monoclonal	1:100	DAKO	EMRO2

Como controle positivo foram utilizadas:

- Receptor de Androgênio: lisado de células LNCap*
- Aromatase: lisado de tecido placentário**
- Receptor de estrogênio alfa: lisado de células MCF-7***
- Receptor de estrogênio beta: lisado de células MDA***

*Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Hernandez Faustino de Carvalho– Instituto de Biologia- Departamento de Biologia Celular – Unicamp

**Obtido através de tecido placentário fresco, armazenado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia Bucal da FOU SP.

***Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ruy Jaeger e Profa. Dra. Vanessa Freitas – Instituto de Ciências Biomédicas- Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento – ICB - USP – SP

O experimento foi realizado em duplicata e as proteínas estudadas foram analisadas em relação à expressão.

4.5 Imuno-fluorescência

As linhagens de OSCC9 e OSCC25 foram submetidas à reação de imunofluorescência com anticorpos contra as proteínas aromatase, receptor de androgênio e receptor de estrogênio alfa e beta.

A Imuno-fluorescência foi realizada sob lamínulas de vidro com diâmetro compatível com placas de 12 poços.

As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e depois fixadas com metanol por 6 min., a -20°C. Após esse período, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS para a posterior realização do bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de PBS + BSA (albumina sérica bovina) a 1% (50 µL/lamínula), por 30 min.

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + BSA a 1% nas concentrações e tempo de incubação descritos na Tabela 4.5. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS.

Tabela 4.5 – Especificações técnicas dos anticorpos utilizados na Imuno-fluorescência

Soro	Tipo	Concentração	Procedência	Clones	incubação
Androgênio	monoclonal	1:25	DAKO	ON-15	45 min
Aromatase	monoclonal	1:25	ABD -SEROTEC	H4	45 min
Estrogênio alfa	monoclonal	1:50	DAKO	1D5	45 min
Estrogênio beta	monoclonal	1:50	DAKO	EMRO2	45 min

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS para que fossem incubadas, por 45 min., com anticorpo secundário (50 µL/lamínula) [Fluoresceína IgG (H+L), Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA, USA] na concentração 1:50, também diluído em solução de bloqueio. Nessa etapa, a reação foi realizada na ausência de luz. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas de vidro com Vecta Shild® (Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA, USA).

As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e armazenadas na geladeira, na ausência de luz, para posterior análise no microscópio de imunofluorescência (Axio Imager.A1-Zeiss, Câmera: Axio Cam HRc-Zeiss, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

As proteínas estudadas foram analisadas em relação à expressão e ao padrão da marcação.

4.6 Testes Estatísticos

Foram realizados testes estatísticos descritivos utilizando o teste do Qui-quadrado com correção de Yates e o teste Exato de Fisher, para verificar se havia associação de gênero, tamanho e duração da lesão com positividade para as proteínas analisadas. Os cálculos foram realizados utilizando o software BioEstat3.0 (Sociedade Civil Mamiarauá, Belem, Pará, Brasil), adotando-se 5% como nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas da população de estudo

A análise dos dados demográficos relativos aos 60 espécimes de pacientes com CE revelou uma predominância de indivíduos da raça branca (65,0%), seguidos pela raça negra (26,7%). A raça amarela totalizou 3,3% da amostra e apenas um caso (1,6%) não teve sua raça especificada. (Tabela 5.1). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as frequências de raça branca, negra e amarela comparando-se os sexos masculino e feminino.

Tabela 5.1 – Distribuição de frequência dos pacientes do gênero feminino e masculino com carcinoma epidermóide oral segundo os dados demográficos. Faculdade de Odontologia de São Paulo/USP

Característica	Feminino (n=30)	Masculino (n=30)	Valor de p
Raça (%)			
Branca	19 (63.3)	20 (66.6)	0.794
Negra	7 (23.3)	9 (30.0)	0.771
Amarela	2 (6.6)	0 (0.0)	0.491
Outra	1 (3.3)	1 (3.3)	*
NE	1 (3.3)	0 (0.0)	*
Idade - mediana (valores mínimo e máximo)	69 (39-90)	56 (44-83)	0.057
Tempo de duração da lesão em meses (mediana – valores mínimo e máximo)	3 (1-48)	4 (1-24)	0.627
Tamanho da lesão em mm (mediana – valores mínimo e máximo)	30 (5-110)	35 (5-100)	0.164
Localização (%)			
Língua	15 (50.0)	9 (30.0)	0.187
Assoalho bucal	4 (13.3)	9 (30.0)	0.209
Rebordo alveolar	2 (6.7)	8 (26.7)	0.046
Mucosa Jugal	4 (13.3)	1 (3.3)	0.202
Palato mole	2 (6.7)	1 (3.3)	*
Lábio inferior	1 (3.3)	1 (3.3)	*
Parótida	1 (3.3)	1 (3.3)	*
Pilar Amigdaliano	1 (3.3)	0 (0.0)	*

* Sem estatística devido à baixa frequência.

NE – não especificado.

Teste Exato de Fisher. Significante quando $p < 0.05$

A idade mínima dos pacientes foi de 39 anos para o sexo feminino e de 44 anos para o sexo masculino (Tabela 5.1). A mediana das idades foi de 69 e 56 anos, respectivamente para o sexo feminino e masculino. Não houve diferenças entre os sexos nesse quesito. (Tabela 5.1).

Como pode ser visualizado na Tabela 5.1, a mediana do tempo de duração da lesão foi de 3 meses para o sexo feminino e de 4 meses para o sexo masculino. Oito casos (13,3%) apresentaram lesões com duração de seis a doze meses e apenas três pacientes (5,0%) relataram possuir a lesão por mais de doze meses, sendo duas mulheres (3,3%) e um homem (1,7%). Não se observou diferença estatisticamente significativa no teste de associação entre sexo e duração da lesão (Tabela 5.1).

Os CE apresentavam dimensões que variaram de 5mm a 100-110mm. A mediana do tamanho foi 30 mm para o sexo feminino e de 35 mm para o sexo masculino. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes comparando-se o tamanho da lesão com ambos os sexos separadamente (tabela 5.1).

Os CEs apresentaram-se em diversos locais da mucosa bucal (tabela 5.1). O local mais acometido foi a língua, em um total de 24 casos (40,0%), sendo 15 do gênero feminino (25,0%) e 9 do masculino (15,0%). O assoalho bucal foi a segunda localização mais comum: 13 casos (21,7%), sendo nove (15,0%) em homens e quatro (6,7%) em mulheres. O rebordo alveolar foi acometido em dez casos (16,6%), oito ocorreram em homens (13,3%) e dois em mulheres (3,3%). Para o rebordo houve associação significativa entre essa localização e o sexo ($p=0.046$).

5.2 Imuno-histoquímica

A Tabela 5.2 mostra o total de reações imuno-histoquímicas positivas e negativas para cada proteína analisada, sem haver distinção entre os sexos. Observa-se que, para todos os anticorpos realizados, a frequência de reações negativas foi maior do que as positivas nos CE amostrados; o teste estatístico do qui-quadrado evidenciou haver associação entre o tipo de proteína analisada e a frequência de positividade ($p<0,001$). Analisando-se então dois a dois os tipos de

proteínas, observou-se que a frequência de positivos para o RE α foi significativamente menor em relação ao RA ($p = 0.016$) e ao RE β ($p < 0,001$). O RE β ainda exibiu frequência significativamente maior em relação à Aro ($p = 0,003$). Não houve diferenças significativas na frequência de positividade comparando-se o RA com o de RE β e com a Aro nem entre esta e o RE α .

Tabela 5.2 – Frequência de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para cada anticorpo utilizado, sem distinção entre os sexos

	Androgênio	Aro	EAlfa	EBeta	P
Positivos (%)	16 (26.6)	8 (13.3)	5 (8.3)	23 (38.3)	
Negativos (%)	44 (73.4)	52 (86.4)	55 (91.4)	37 (61.4)	<0.001
Total	60 (100.0)	60 (100.0)	60 (100.0)	60 (100.0)	

E = estrogênio. Teste do Qui-quadrado. Significante quando $p < 0.05$.

a = estatisticamente significativo quando comparado com receptor para androgênio.

b = estatisticamente significativo quando comparado com o receptor para estrogênio beta.

A imunoexpressão do RA foi encontrada em 4 casos (13,3%) de CE em mulheres e em 12 lesões (40%) em homens (Tabela 5.3 e Figura 5.1A e B). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,023$). Já a pouca marcação (8 casos) pela Aro, sendo 6 (20,0%) neoplasias no gênero feminino e 2 (6,7%) no gênero masculino, não apresentou diferença significativa ($p = 0,153$) na comparação entre os gêneros (Tabela 5.3 e Figura 5.1C e D). Resultado semelhante foi observado para o RE α ; o número de casos que expressaram esse receptor foi ainda menor que da aromatase: 3 (10%) do gênero feminino e dois (6,7%) do masculino ($p = 0,676$) (Tabela 5.3 e Figura 5.1G e H). O anticorpo anti-receptor de estrogênio beta foi responsável pelo maior número de casos de CE marcados, tanto no gênero feminino (12 = 40%) quanto no masculino (11 = 36,7%) (Figura 5.1E e F). Para esse anticorpo também não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros ($p = 0,798$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Frequência de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para cada anticorpo utilizado, segundo o sexo (n = 60)

RA	Feminino	%	Masculino	%	P
Positivo	4	13,3	12	40	0,023
Negativo	26	86,7	18	60	
Total	30	100,0	30	100	

Aromatase	Feminino	%	Masculino	%	P
Positivo	6	20,0	2	6,7	0,153
Negativo	24	80,0	28	93,3	
Total	30	100,0	30	100,0	

RE α	Feminino	%	Masculino	%	P
Positivo	3	10,0	2	6,7	0,676
Negativo	27	90,0	28	93,3	
Total	30	100,0	30	100,0	

RE β	Feminino	%	Masculino	%	P
Positivo	12	40,0	11	36,7	0,798
Negativo	18	60,0	19	63,3	
Total	30	100,0	30	100,0	

Teste Exato de Fisher. Significante quando $p < 0.05$.

A Tabela 5.4 mostra o cruzamento entre tamanho da lesão e a expressão imuno-histoquímica de cada proteína analisada no sexo feminino. Como a mediana do tamanho das lesões foi 30 mm (Tabela 5.1), para essa análise as lesões foram divididas entre $\geq 30\text{mm}$ e $< 30\text{mm}$. Observou-se diferença estatisticamente significativa para o RE β , indicando que a maior frequência de positividade para o receptor desse hormônio está associada a lesões maiores que 30mm. Para o sexo masculino, em nenhum dos hormônios foi possível verificar associação significativa com o tamanho da lesão (Tabela 5.5).

Tabela 5.4 – Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação ao tamanho da lesão (n=27*)

	RA			Aro			RE α			RE β		
$\geq 30\text{mm}$	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
Sim	2	12	0,481	2	11	1,00	2	12	1,00	8	6	0,046
Não	0	13		2	11		1	12		2	11	

* Três espécimes estavam sem informação sobre tamanho.

(+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quando $p < 0,05$.

Tabela 5.5 – Freqüência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação ao tamanho da lesão (n = 30)

	RA			Aro			RE α			RE β		
	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
$\geq 30\text{mm}$												
Sim	8	12	0,99	2	18	0,540	1	19	1,00	9	11	0,690
Não	4	6		0	10		1	9		3	7	

(+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quanto $p < 0,05$.

As Tabelas 5.6 e 5.7 mostram, respectivamente para o sexo feminino e masculino, as freqüências de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para cada anticorpo em relação à idade. Como a mediana de idade foi de 69 anos no sexo feminino e 59 anos no sexo masculino (Tabela 5.1), optou-se por agrupar as lesões em ≥ 60 anos ou < 60 anos para efetuar essa avaliação. Não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhuma das proteínas em ambos os sexos, o que indica não haver associação entre positividade de marcação e idade na amostra estudada.

Tabela 5.6 – Freqüência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação à idade (n = 29*)

Idade	RA			Aro			RE α			RE β		
	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
≥ 60 anos												
Sim	3	15	1,000	3	15	0,645	2	16	0,512	5	13	0,239
Não	1	10		3	8		0	11		6	5	

* Um caso não apresentou informação sobre idade. (+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quanto $p < 0,05$.

Tabela 5.7 – Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação à idade (n = 26*)

Idade	RA			Aro			RE α			RE β		
	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
≥60 anos												
Sim	4	8	0,701	1	11	1,000	1	11	0,461	5	7	1,000
Não	6	8		1	13		0	14		6	8	

* Quatro casos não apresentaram informação sobre idade. (+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quanto $p < 0,05$.

As Tabelas 5.8 e 5.9 mostram, respectivamente para os sexos feminino e masculino, as frequências de testes imuno-histoquímicos positivos e negativos para todos os anticorpos considerando-se a duração da lesão. Como a mediana da duração da lesão foi de 3 meses para o sexo feminino e de 4 meses para o masculino, optou-se por separar as lesões em ≥ 3 meses e < 3 meses. Não houve diferenças estatisticamente significantes para os gêneros nesses testes. Indicando não haver associação entre positividade de marcação imuno-histoquímica e duração da lesão na amostra estudada.

Tabela 5.8 – Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo feminino, em relação à duração da lesão (n = 26*)

Duração	RA			Aro			RE α			RE β		
	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
≥3 meses												
Sim	0	12	0,483	3	9	0,634	2	10	0,580	6	6	0,421
Não	2	12		2	12		1	13		4	10	

* Quatro casos não apresentaram informação sobre duração da lesão. (+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quanto $p < 0,05$.

Tabela 5.9 – Frequência de situações com positividade e negatividade imuno-histoquímica para cada anticorpo utilizado nos pacientes do sexo masculino, em relação à duração da lesão (n = 24*)

Duração	RA			Aro			REα			REβ		
≥ 3 meses	+	-	p	+	-	p	+	-	p	+	-	p
Sim	7	3	0,239	0	13	0,199	0	13	0,458	6	7	0,696
Não	6	8		2	9		1	10		4	7	

* Seis casos não apresentaram informação sobre duração da lesão. (+) positividade imuno-histoquímica. (–) negatividade imuno-histoquímica. Teste Exato de Fisher. Significante quanto $p < 0,05$.

Figura 5.1 – Imuno-histoquímica: (A, B) Expressão nuclear da proteína de RA em CE e controle; (C, D) Expressão citoplasmática da proteína Aro em CE e controle; (E, F) Expressão nuclear da proteína de RE β em CE e controle; (G, H) Expressão nuclear do RE α em CE e controle.

WESTERN BLOTTING E IMUNO-FLUORESCÊNCIA

Foi observado que a proteína para RA foi expressa apenas na linhagem celular OSCC9 (Figura 5.2). A linhagem OSCC25 não apresentou expressão, quando comparada à linhagem controle (LNCap) (Figura 5.2). O resultado apresenta-se similar na técnica de imuno-fluorescência, na qual se verificou expressão positiva e nuclear do receptor de androgênio nas OSCC9 e expressão negativa nas OSCC25 (Figura 5.3 Ae B).

Notou-se expressão positiva da proteína de RE β tanto na OSCC9 quanto na OSCC25 (Figura 5.2), bem como, imuno-marcação nuclear intensa na imuno-florescência (Figura 5.3G e H).

Comparando com a linhagem controle para o RE α (MCF-7), as duas linhagens de CE exibiram expressão negativa. Resultado semelhante foi encontrado na técnica de imuno-fluorescência (Figura 5.3E e F).

A expressão da proteína anti-aromatase foi observada no western blotting (Figura 5.2) e também nas duas linhagens celulares pela imuno-fluorescência, exibindo padrão de marcação citoplasmático (Figura 5.3C e D).

Figura 5.2 – Western blotting: Expressão das proteínas de RA, Aro, RE β , RE α e β -actina nas linhagens celulares de CE (OSCC9 e OSCC25) e nos seus respectivos controles.

Figura 5.3 – Imuno-fluorescência: (A) Expressão nuclear da proteína de RA na OSCC9; (B) Ausência de expressão da proteína de RA na OSCC25 - DAPI; (C, D) Expressão citoplasmática da proteína Aro nas OSCC9 e OSCC25; (E, F) Ausência de expressão da proteína de RE α nas OSCC9 e OSCC25 - DAPI; (G, H) Expressão nuclear da proteína de RE β nas OSCC9 e OSCC25.

6 DISCUSSÃO

Como citado previamente, o câncer de boca apresenta grande incidência em todo o mundo (Barnes et al., 2005), incluindo o Brasil (INCA), e altas taxas de mortalidade e morbidade (Sidranski, 1995; Massano et al., 2006; Bagan; Scully 2007, Scully; Bagan 2009). Das diversas neoplasias denominadas câncer de boca, mais de 90% tem o diagnóstico de carcinoma epidermóide (Silverman, 2001) e devido a sua etiologia multifatorial e patogênese complexa e não totalmente elucidada, os meios atuais para a prevenção e controle da doença não apresentam efeitos mais significativos quando comparados aos das últimas décadas (Silverman, 2001) e quando comparados ao progresso no manejo de outros tumores (Landis et al., 1999). Por isso, a busca por identificar outros tipos de proteínas e vias envolvidas no processo da carcinogênese oral tem sido um assunto de muito interesse e muita importância.

A via hormonal da carcinogênese oral tem sido estudada (Molteni et al., 1981; Schuller et al., 1984; Nehse; Tunn 1994; Dos Santos et al., 2004; Cheng et al., 2006; Lukits et al., 2007; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe, 2007; Nelson et al., 2007; Kim et al. 2007) devido ao importante papel dos hormônios esteróides na tumorigênese dos órgãos reprodutivos (Katzenellenbogen et al., 2000; Bord et al., 2001; Brinkman 2001; Imagawa et al., 2002; Fuchs et al., 2003; Cunha et al., 2004; Rocheford 2008; Cheng et al., 2006; Bakker, Baumm, 2007; Ishida et al., 2007), buscando-se novos fatores prognósticos e novas estratégias terapêuticas (Molteni et al., 1981; Schuller et al., 1984; Nehse; Tunn 1994; Dos Santos et al., 2004; Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007; Nelson et al., 2007; Ku E Crowe, 2007; Kim et al., 2007).

A literatura não é extensa a respeito das vias hormonais na carcinogênese oral (Molteni et al., 1981; Schuller et al., 1984; Nehse; Tunn 1994; Dos Santos et al., 2004; Cheng et al., 2006; Lukits et al., 2006; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe 2007; Nelson et al., 2007; Kim et al., 2007) e esses estudos se baseiam-se nos conceitos, já consolidados, elaborados através do estudo das lesões neoplásicas em órgão reprodutivos, cujo maior e mais expressivo exemplo é a mama. Isso justifica o maior número de pesquisas avaliando a expressão do receptor de estrogênio, quando

comparada aos outros receptores de hormônios esteróides, nos trabalhos que estudam a via hormonal da carcinogênese.

Através dessa constatação, a proposta desse trabalho foi avaliar não só os receptores de estrogênio – α e β - mas constituintes importantes para a biosíntese do estrogênio: a presença dos receptores do androgênio e da aromatase – a enzima responsável por transformar o androgênio em estrogênio (Huber et al., 2002; Simpson 2003; Cheng et al., 2006;). Até o presente momento, nenhum outro estudo foi conduzido avaliando essa via em CEs orais.

O fato do CE afetar principalmente indivíduos do gênero masculino (Silverman 2001; Barnes et al., 2005; Scully, Bagan 2009; Marocchio et al., 2010), também é uma evidência que sugere que a carcinogênese oral possa estar relacionada com as grandes diferenças hormonais existentes entre os gêneros (Nehse ; Tunn, 1994; Dos Santos et al., 2004; Suba 2007).

A análise dos dados clínicos dos casos selecionados para o presente estudo mostrou que os pacientes portadores das lesões de CE, apresentaram idade e localização das lesões compatíveis com o padrão epidemiológico da literatura (Silverman, 2001; Barnes et al., 2005; Scully, Bagan, 2009; Marocchio et al., 2010). Notamos também que a escolha da amostra com o mesmo número de indivíduos do gênero feminino e masculino, não influenciou na localização das lesões e nem determinou diferenças de raças em ambos os gêneros (Tabela 5.1). Embora as lesões de lábio tenham como fator iniciante da carcinogênese a radiação solar, optamos por deixar casos nessa localização pois a evolução desse processo também pode se dar através da via hormonal.

O artigo mais antigo encontrado na literatura avaliando, através da imunocitoquímica, a presença de receptores de estrogênio em neoplasia de cabeça e pescoço (Molteni et al., 1981), observou que entre as diversas neoplasias estudadas, quatro dos seis carcinomas epidermóides de boca apresentavam grande quantidade desses receptores, sugerindo que a terapia hormonal poderia influenciar a evolução biológica desses tumores. Ainda nesse período, a literatura apresentou observações controversas a respeito dos receptores hormonais em carcinomas epidermóides de boca. Schuller et al. (1984), estudaram a expressão de receptores de estrogênio e progesterona em 65 espécimes de neoplasias de cabeça e pescoço,

sendo que dessas 57 eram CE de diversas localizações e 19 eram CE de boca. Embora os autores não tenham especificado por tipo de lesão e localização, apenas dois casos entre todos os selecionados foram positivos para receptores de estrogênio e nenhum positivo para os receptores de progesterona. Concluíram então que essas neoplasias não poderiam ser hormônio - dependentes.

A padronização das reações imunohistoquímicas do presente estudo, foi baseada tanto em protocolos já publicados em CE de boca (Cheng et al., 2006; Ishida et al., 2007) como também naqueles utilizados para as neoplasias de mama e próstata. Com isso, observou-se que os protocolos dessas reações para essas proteínas são muitos variados – tipo de anticorpo primário, tipo de recuperação antigênica, tempo de incubação e complexo de anticorpos secundário e terciário. Como resultado disso, a literatura afirma que não existe método universalmente aceito para a detecção dessas proteínas através da reação imunohistoquímica (Taylor et al., 1994; Rocha et al., 2008; Hammond et al., 2010).

Ainda durante essa etapa do estudo notou-se que os espécimes utilizados como controle apresentavam uma boa qualidade de reação com a maioria dos protocolos, no entanto, os carcinomas epidermóides selecionados exibiram reações de melhor qualidade quando submetidas ao protocolo nós utilizado, como descrito no capítulo *material e métodos*.

Em nossa opinião, muito importante para as reações de IHQ nos CEs foi a utilização do método do polímero marcado (Kit Advance – DAKO), que aumenta a exposição dos antígenos presentes, possibilitando maior visibilidade do resultado da reação quando ligado à substância cromógena. A necessidade desse sistema de detecção de antígenos mais sensível pode estar relacionada com alguns fatores, inerentes às condições de trabalho do pesquisador e determinantes para esse tipo de procedimento laboratorial: a duração e o tipo de fixação do tecido, o método de processamento tecidual e a localização do antígeno (Taylor et al., 1994)

Além da técnica utilizada, outro fator de discrepância entre os resultados desse tipo de reação é o método de avaliação da imunoexpressão dessas proteínas (Rocha et al., 2008; Hammond et al., 2010), principalmente em relação aos receptores de estrogênio e progesterona. Em cancer de mama, muitos estudos avaliam a expressão dessas proteínas através de um método semi-quantitativo, que considera tanto a intensidade da coloração quanto a porcentagem de núcleos

marcados (Rocha et al., 2008; Hammond et al., 2010). Já outras pesquisas excluem a intensidade da coloração, devido à demonstração de que esse fator não tem importância prognóstica ou relação com o resultado do tratamento (Rocha et al., 2008). Embora Harvey et al., tenham demonstrado que pacientes apresentando 1% ou mais das células tumorais de carcinoma de mama expressando receptor de estrogênio, em intensidade moderada ou forte, responderam positivamente a terapia hormonal (Harvey et al; 1999), existe também uma variação na interpretação do escore inicial da marcação do receptor de estrogênio, variando de 1% a 10%, considerando ou não a intensidade (Hammond et al., 2010). De acordo com as recomendações de Hammond et al (2010), nessa pesquisa consideramos positivos os tumores que apresentavam $\geq 1\%$ das células marcadas ou ausência de imunoexpressão das proteínas, sem utilizar a intensidade da marcação imunohistoquímica.

No presente estudo, avaliando-se o total de reações imunoistoquímicas efetuadas, sem distinção do anticorpo utilizado, observou-se que não houve diferenças estatísticas entre a frequência de positividade e negatividade entre os gêneros. (Tabela 5.2 e 5.3).

Nas três técnicas laboratoriais utilizadas, o RE β foi o mais expresso, nos dois gêneros e nas duas linhagens celulares (Tabela 5.2 e 5.3 e Figura 5.1 E, 5.2 e 5.3 G e H.), enquanto que o RE α exibiu resultados contrários: foi o menos expresso nas reações imunohistoquímicas e ausente nas duas linhagens celulares utilizadas. (Tabela 5.2 e 5.3 e Fig 5.1 G, 5.2 e 5.3 E e F).

Ishida et al. (2007) avaliando a presença de receptores de estrogênio α e β em três linhagens celulares primárias de lesões de CE de língua e em uma linhagem de CE de gengiva através de imunohistoquímica e western blotting, obtiveram resultados semelhantes aos nossos nas quatro linhagens celulares em relação à expressão da proteína do RE β . No entanto, os autores observaram também discreta presença da proteína do RE α , não somente nas reações imunohistoquímicas como em nossa pesquisa, mas também no western blotting. Sugerindo que esses receptores possivelmente desempenhem funções diferentes nos CEs.

A presença das duas isoformas dos receptores de estrogênio através de western blotting também foi observada por Kim et al. (2007), nas três linhagens celulares utilizadas: CE de glândula submandibular, CE de língua e CE de mucosa.

Os autores ressaltam ainda que a expressão do $RE\alpha$ nas linhagens de CE derivadas de glândula submandibular e de mucosa foi muito maior do que a que exibiu o controle MCF-7, sugerindo que o padrão de expressão desses receptores possa estar associado à origem e tipos celulares de cada tumor.

Apesar do resultado coincidente na expressão dos $RE\beta$ na técnica de western blot observado nos dois trabalhos citados anteriormente e no presente estudo, observou-se grande variação na presença da proteína dos $RE\alpha$. Esse fato pode estar relacionado às diferentes linhagens celulares utilizadas, corroborando com a idéia de Kim et al. (2007) de que diferentes linhagens celulares de CE apresentem diferentes padrões de expressão dos receptores de estrogênio.

Outro fato que pode ser considerado na discrepância dos resultados desse estudo com os dois anteriores é o tipo de anticorpo utilizado. Enquanto utilizamos anticorpos monoclonais e da marca DAKO as outras pesquisas fizeram uso de anticorpos policlonais e da marca Santa Cruz.

Através de diferentes técnicas laboratoriais, outras pesquisas também relataram a presença dos $RE\alpha$ em células em carcinoma epidermóide.

Ku e Crowe (2007), avaliando somente a presença desse receptor em linhagens celulares de CE de boca: OSCC4, OSCC9, OSCC25, obtiveram resultado semelhante aos de Ishida et al, encontrando baixo nível de expressão proteica desse receptor, utilizando diferentes linhagens celulares e o mesmo tipo de anticorpo. Dessas três linhagens, duas foram utilizadas em nosso trabalho: OSCC9 e OSCC25- ainda assim, não observamos a presença dessa proteína. Além da diferença entre os anticorpos utilizados, observou-se que a quantidade de proteína utilizada pelos autores para realizar a técnica de western blot foi quase três vezes superior (75 μ g) à quantidade que utilizamos nesse trabalho (24 μ g), podendo ser esse mais um fator responsável pela diferença.

Por outro lado, Ishida et al. (2007) utilizaram em sua metodologia 10 μ g de proteínas de cada tipo celular e obtiveram resultados semelhantes a Ku e Crowe (2007) demonstrando que essas variações de metodologia influenciam também nos resultados obtidos no western blotting, assim como já discutido na técnica da imunohistoquímica, e evidenciando a importância dos controles positivos e negativos em todas as reações.

Lukits et al 2007, avaliando a presença de receptores de estrogênio e progesterona em neoplasias malignas de cabeça e pescoço, através da imunocitoquímica, observaram que dos casos de CE de boca, um maior número apresentou a expressão dos receptores alfa do que beta.

Nelson et al (2006), através de PCR, também observaram a expressão variável dos dois tipos de receptores de estrogênio em três linhagens celulares de CE de soalho bucal, sugerindo que essas variações possam ser devido a diferença das linhagens celulares: as três linhagens eram provenientes da mesma paciente mas foram obtidas em momentos diferentes da progressão do tumor: da primeira recorrência do tumor em soalho (A), da segunda recorrência após tratamento de radioterapia (B) e da terceira recorrência após a quimioterapia(C).

Os dois últimos estudos voltam a corroborar com a hipótese de Kim et al (2007) de que diferentes linhagens celulares de CE de boca possam exibir diferentes padrões de expressão das duas isoformas dos receptores de estrogênio.

Em alguns estudos já citados acima (Ishida et al., 2007; Ku; Crowe 2007; Kim et al 2007), avaliou-se também os efeitos de um antagonista (tamoxifeno) dos RE, nas diferentes linhagens celulares de CE de boca. Independente do tipo de receptor avaliado (α ou β) e da linhagem celular observou-se que o antagonista do RE determinou a inibição da proliferação celular, a diminuição da adesão celular e modificações no citoesqueleto que levou a apoptose das células neoplásicas. Portanto, independente da distribuição dos receptores de estrogênio, a sua inibição, pode ser uma terapia potente para prevenção da progressão e invasão tumoral.

Outro dado significativo do presente estudo, foi a associação positiva encontrada nas lesões de CE do gênero feminino maiores que 30mm e a expressão do RE β (Tabela 5.4, $p=0,046$), indicando que a maior frequência de positividade para esse hormônio está associada a lesões maiores que 30mm nesse gênero. Especulativamente, com base nos resultados de Ishida et al. (2007), Kim et al. (2007) e Ku e Crowe (2007) essa constatação poderia sugerir que devido a uma maior disponibilidade de estrogênio no organismo feminino e expressão aumentada dos Re β , através da ligação dos receptores com o estrogênio, a proliferação celular poderia estar aumentada, determinando neoplasias maiores.

A presença e quantidade das duas isoformas dos receptores de estrogênio é,

atualmente, mais estudada em câncer de mama, ovário, cólon e próstata (Fixemer et al., 2003, Bardini et al., 2004; Carruba, 2007). Esses estudos relatam que esses tipos de neoplasias apresentam diminuição ou perda da expressão de RE β e aumento da relação Re α / RE β quando comparados aos respectivos tecidos não doentes. (Skrilis et al 2003, Bardini et al., 2004; Carruba, 2007), demonstrando também que durante o processo da carcinogênese a relação Re α / RE β fica aumentada, sugerindo que a perda da expressão do RE β seja um dos indicadores do início desse processo (Skrilis et al 2003). Além disso, as pesquisas sugerem que o RE β desempenhe um papel protetor nos tecidos, através da inibição da atividade mitogênica determinada pela presença do estrogênio em lesões pré-malignas em glândulas mamárias (Roger et al., 2001) e em próstata (Carruba, 2007). Bardini et al. (2004) chegaram a aventar a hipótese de se considerar os RE β como um potencial gene supressor de tumor.

No entanto, no presente estudo verificou-se maior expressão de RE β e pouca presença de Re α , ou seja, uma relação Re α / RE β diminuída, situação oposta daquelas observadas nas neoplasias de mama, ovário, cólon e próstata (Skrilis et al 2003, Roger et al., 2001, Carruba, 2007). Nos estudos citados anteriormente, (Lukits et al., 2006; Ishida et al., 2007; Ku; Crowe, 2007; Nelson et al., 2007; Kim et al 2007) que também avaliaram a expressão dos Re α e RE β em CE de boca, não se observou nenhum tipo de relação entre Re α / RE β . Além disso, observou-se que na presença do tamoxifeno, independente da distribuição dos receptores de estrogênio, houve diminuição da proliferação celular (Ishida et al., 2007; Ku; Crowe 2007; Kim et al., 2007). Especulativamente poderíamos sugerir que em lesões de CE de boca esses dois tipos de receptor de estrogênio desempenhem papéis diferentes daqueles que exercem nas neoplasias dos órgãos reprodutivos. Além disso, seria válido também conduzir mais estudos comparando a expressão desses receptores em tecido de mucosa bucal normal.

Com base nesses resultados, pode-se aventar a hipótese de que a avaliação dos receptores de estrogênio em carcinomas epidermóides orais seja um teste laboratorial importante, podendo determinar, em casos de neoplasias positivas para esses receptores, possibilidade de mais um tipo de protocolo terapêutico.

Nessa pesquisa os RA foram os receptores com o segundo lugar em imunoexpressão, nos dois gêneros (26.6%), sendo observados também através do

western blotting e imunofluorescência nas células da linhagem OSCC9 (Figura 5.1A, 5.2 e 5.3A e B), com localização nuclear. Porém na maioria dos tumores (44) esse receptor não foi observado. Já Nehse e Tunn (1994), embora utilizando metodologia diferente, observaram a expressão do receptor de androgênio em 13 dos 18 CEs de boca estudados. Interessantemente os autores observaram que os níveis de concentração dos receptores de androgênio são mais baixos nos CE do que em mucosa normal, sugerindo que a transformação maligna possa estar associada a diminuição da concentração desse receptor.

Ao compararmos a expressão dos RA entre homens e mulheres observou-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 5.3), evidenciando maior presença desses receptores em neoplasias de indivíduos do gênero masculino.

Outra questão interessante abordando os RA em carcinomas epidermóides bucais que acometem homens, foi estudada por Dos Santos et al. (2004). Nessa pesquisa avaliou-se a diferença entre homens portadores de carcinoma epidermóide e homens sem carcinoma epidermóide, da repetição CAG no primeiro exon no gene do RA. Os autores constataram a presença de gene do RA com mais de 20 repetições CAG nos homens com CE, sugerindo que essa sequência de repetições no gene do AR também possa ser utilizada como fator preditivo para os indivíduos do gênero masculino.

Esses resultados sugerem que a expressão dos AR em CEs, principalmente dos indivíduos do gênero masculino merece ser mais investigada.

A atuação da enzima aromatase ocorre na membrana do retículo endoplasmático, portanto seu local de atuação é citoplasmático (Ghosh et al., 2009). Por isso a marcação da Aro foi considerada positiva quando observada no citoplasma nas reações imunohistoquímicas (Figura 5.1C). A enzima aromatase apresentou-se expressa em apenas oito CEs, quando avaliada pela técnica da imunohistoquímica, no entanto, sua presença foi notada nas duas linhagens celulares utilizadas. No western blotting essa proteína apresentou expressão semelhante ao controle nas duas linhagens (Figura 5.2) e na imunofluorescência observou-se padrão de marcação puntiforme citoplasmático não intenso (figura 5.3 C e D). Corroborando com nossos resultados Cheng et al. (2006) avaliando a presença da Aro e seus diferentes éxons em linhagens celulares de queratinócitos normais, em linhagem celulares de CE e em carcinomas epidermóides de boca

(tecido fresco e tecido em parafina) através da imunocitoquímica, imunohistoquímica e PCR-RT, observaram a presença da enzima tanto nos CEs (tecido fresco e tecido em parafina) como nas linhagens celulares de queratinócitos normais e de CE.

A maior discrepância entre os resultados desse artigo e do presente estudo é a imunoexpressão positiva da aromatase nos casos de CE arquivados. No entanto, os autores associaram a expressão da aromatase com a diferenciação do tumor: dos quatorze casos de CE parafinados, submetidos à técnica de imunohistoquímica, sete eram bem diferenciados e sete pouco diferenciados, sendo que, nenhum dos pouco diferenciados apresentou a enzima, enquanto que seis dos bem diferenciados exibiram a marcação citoplasmática dessa proteína (Cheng et al., 2006). Sugerindo que a presença da Aro esteja diretamente relacionada ao grau de diferenciação do tumor.

Apesar da dificuldade em classificar lesões removidas incisionalmente, a maioria das neoplasias no presente estudo eram pouco diferenciadas, o que talvez possa justificar a discrepância dos resultados imunohistoquímicos obtidos.

É importante ressaltar que a linhagem celular (OSCC25) utilizada no estudo conduzido por Cheng et al. (2006) foi uma das que utilizamos nesse estudo, e que apesar dos autores terem utilizado a técnica da imunocitoquímica e um anticorpo diferente do nosso para essa técnica, nas duas pesquisas a aromatase foi observada.

Os resultados positivos da aromatase, mesmo que não em todas as neoplasias, indicam que pode haver a produção local de estrogênio nesses tumores, que poderia agir de maneira autócrina, ligando-se aos seus receptores (RE) e estimulando a proliferação de células neoplásicas através do aumento da transcrição de DNA (Cheng et al., 2006; Mangelsdorf et al., 1995), confirmando mais uma vez, a importância da investigação dos receptores hormonais e também da aromatase nesse tipo de lesão.

7 CONCLUSÕES

A constatação da presença dos receptores de estrogênio (alfa e beta), dos receptores de androgênio e da enzima aromatase em parte dos espécimes de carcinomas epidermóides orais e nas linhagens celulares de carcinoma epidemóide utilizadas nesse estudo, sugerem que os hormônios esteróides possam, de alguma forma, participar dos processos de carcinogênese e progressão de alguns desses tumores, especialmente os receptores de androgênio em neoplasias que acometem indivíduos do gênero masculino, do estrogênio beta em ambos os gêneros e da enzima aromatase que parece estar associada a diferenciação dos tumores.

Ainda que a expressão dessas proteínas não tenha sido observada em todos os casos, esses resultados evidenciaram a necessidade da investigação mais detalhada da via hormonal na carcinogênese oral como parte da tentativa da instituição de novos protocolos terapêuticos e fatores preditivos, ainda que somente em alguns casos.

REFERÊNCIAS¹

- Aguiar FCA Jr, Kowalski LP, Almeida OP. Clinicopathological and immunoistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol.* 2007;(43): 593-601.
- Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol.* 2008;44(2):103-8.
- Bakker J, Baumm MJ. Role for estradiol in female typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 2007, doi:10.1016/j.yfrne.2007.06.001.
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(3):537-51.
- Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. 2005, 1a ed. Lyon:IARC Press. Cap.5, p.211-12.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer Estimativas de Incidência e de Mortalidade do Câncer em 2006. Rio de Janeiro. Acessado em 14/08/2007.
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2309-14
- Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Moll Cell Endocrinol.* 2001;179(1-2):105-109.
- Carruba G. Estrogen and Prostate cancer: An eclipsed truth in an Androgen-Dominated Scenario. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;102:899-911.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Cheng YS, Mues G, Wood D, Ding J. Aromatase expression in normal human keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2006;51(7):612-20.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40(5):403-39.

Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif*. 2003;36 Suppl 1:45-58.

Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2006;12(5):443-54. Erratum in: *Oral Dis*. 2006;12(6):584.

.Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2004;94(1):25-39.

Cunha GR, Riche W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, et al. Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92(4):221-36.

Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol*. 2010;61(1):126-34.

Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003;36 Suppl 1:59-72.

Dos Santos ML, Sibov TT, Nishimoto IN, Kowalski LP, Miracca EC, Nagai MA. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene (AR) and its relationship to head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2004;40(2):177-82

Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2003;54(2):79-87

Fuchs KO, Solis O, Tapawan R, Parajpe J. The effects of an estrogen and glycolic acid cream on the facial skin of postmenopausal women: a randomized histologic study. *Cutis* 2003;71 481-8.

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 2009;8;457(7226):219-23.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(6):907-22. Erratum in: *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Aug;134(8):1101.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;May;17(5):1474-81.

Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*. 2004;25(6):869-98.

Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modelling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. *Maturitas*. 2002;20;42(1):1-12.

Ikeda K, Inoue S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*. 2004;67(5):435-42.

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J, Zhang HI. Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80(2):213-30.

Ishida H, Wada K, Masuda T, Okura M, Kohama K, Sano Y, et al. Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2007;98(5):636-43.

Craig Jordan V, Lewis-Wambi J, Kim H, Cunliffe H, Ariazi E, Sharma CG, et al. Exploiting the apoptotic actions of oestrogen to reverse antihormonal drug resistance in oestrogen receptor positive breast cancer patients. *The Breast* 2007, doi:10.1016/j.brest.2007.07.020.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res.* 2000;55:163-93; discussion 194-5.

Kim MJ, Lee JH, Kim YK, Myoung H, Yun PY. The role of tamoxifen in combination with cisplatin on oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):284-92.

Ku TKS, Crowe DL. Coactivator-mediated estrogen response in human squamous cell carcinoma lines. *Journal of Endocrinology* 2007;193(1):147-55.
Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer Statistics, 1999.* *CA Cancer J Clin* 1999;49(1):8-31.

Lukits J, Remenár E, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *Int J Oncol.* 2007;30(1):155-60.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptors superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83(6):835-39.

Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SCO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci.* 2010;52(2):267-73.

Martínez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(9):647-63.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1): 67-76

Molteni A, Warpeha RL, Brizio Molteni L, Fros EM. Estradiol Receptor- Binding protein in head and neck neoplastic and normal tissue. *Arch Surg* 1981;116(2):207-10.

Murphy MJ Jr. Molecular action and clinical relevance of aromatase inhibitors. *Oncologist* 1998;3(2):129-130.

Nehse G, Tunn S. Androgen and progesterone receptors in oral carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 1994;22(2):114-9.

Nelson K, Helmstaedter V, Lage H. The Influence of tamoxifen on growth behavior and cell-cell adhesion in OSCC *in vitro*. *Oral Oncol* 2007;(43):720-7.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(3):973-8.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414(6859):105-11.

Rocha R, Nunes C, Rocha G, Oliveira F, Sanches F, Gobbi H. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract.* 2008;204(9):655-62.

Rocheffort H. .Hormonal metabolism in women: from mechanism to prevention. *C R Biol.* 2008;331(2):104-13. French

Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2005;37(2):182-6.

Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rocheffort H Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* 2001;61(6):2537-41.

Schuller DE, Abou-Issa H, Parrish R. Estrogen and progesterone receptors in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol* 1984;110(11):725-7

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15(6):388-99.

Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc.* 2001;132 Suppl:7S-11S.

Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;86(3-5):225-30.

Sindransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin oncol* 1995;7:22-33.

Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol.* 2003;201(2):213-20.

Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Reprod Med. Semin Oncol.* 2004;31(6):726-33.

Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1523-32.

Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol.* 1994;25(3):263-70.

Tremmel SC, Götte K, Popp S, Weber S, Hörmann K, Bartram CR, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;144(2):165-74.

Tudor D, Locke M, Owen-Jones E, Mackenzie IC. Intrinsic patterns of behavior of epithelial stem cells. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004;9(3):208-14.

ANEXO A -

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 99/2008

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE RECEPTORES DA AROMATASE (Raro), ANDROGÊNIO (RAn) E ESTROGÊNIO ALFA (REa) E BETA (REb) EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA E AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ANDROGÊNIO E ESTROGÊNIO (IN VITRO) EM DUAS LINHAGENS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES"**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) LUCIANA SASSA MAROCCHIO, sob orientação do(a) Prof(a). Doutor(a). SUZANA CANTANHEDE ORSINI DE MACHADO SOUZA.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 10 de junho de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Carqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP