TESSA DE LUCENA BOTELHO

EXPRESSÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS c-erbB-2 E VIMENTINA EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES BUCAIS EM CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PROGNÓSTICO

São Paulo

2009

Tessa de Lucena Botelho

Expressão por imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina em carcinomas epidermóides bucais em correlação com características clínicas e prognóstico

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Botelho TL. Expressão por imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina em carcinomas epidermóides bucais em correlação com características clínicas e prognóstico [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ___/___/___

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus pelo olhar contínuo em todos os momentos, sempre.

Ao meu grande companheiro, meu esteio, minha paz, meu amor, Leandro. Pela sua compreensão e incondicional apoio durante toda esta jornada.

Ao meu grande presente, minha grande inspiração, minha princesa, Tessinha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu grande orientador **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior.** Agradeço-lhe pelo incentivo desde a especialização, pela oportunidade concedida e pelo convívio que sempre me inspira, pelo seu exemplo de vida, de personalidade e de autenticidade. Morfologista invejável, Mestre exemplar e uma pessoa admirável por toda a emoção que deposita nas coisas que acredita. São exemplos como o seu que nos faz acreditar que devemos ser sempre verdadeiros. Agradeço ainda pela compreensão perante as dificuldades e pela plena confiança depositadas. Em muito me orgulha ter sido sua orientada! Muito Obrigada!

À minha querida amiga **Profª. Drª. Andrea Mantesso**, por ter me mostrado que este caminho era possível e acreditar que eu era capaz. Agradeço-lhe pelo irrestrito apoio, pela amizade sincera e pelo exemplo profissional que a cada dia nos inspira e nos orgulha mais. Espero ainda ter oportunidade de trabalharmos juntas!

À minha grande amiga **Flávia Caló de Aquino Xavier** não meço as palavras para dizer que agradeço-lhe por tudo. Pelo carinho e atenção dispensados, sempre. Pelo acolhimento incondicional, pela disponibilidade. Pelo exemplo de pessoa amável, competente e serena. Por todo o trabalho que te dei, sempre! Muito Obrigada! Mas principalmente pela sua amizade, que carregarei para sempre comigo com o amor de uma verdadeira irmã!

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Profª Drª Karen Ortega, Profª Drª Marília Trierveiler Martins, Profª Drª Marina H. C. G. de Magalhães, Profª Drª Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa.** Agradeço pela oportunidade concedida, pela compreensão, pelo convívio e pelos ensinamentos transmitidos.

Às Professoras **Drª Luciana Corrêa** e **Drª Ana Carolina Thomé Cappuano** pelo apoio e pelas contribuições discorridas na ocasião do exame de qualificação. Suas observações em muito engrandeceram este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça** e **Profª Drª Aline Carvalho Batista**. Agradeço-lhes pelo apoio incondicional, pelo incentivo irrestrito, pela total liberdade concedida e pela confiança depositada na abertura do Laboratório de Patologia Bucal da FO-UFG para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

À **Elisa, Zilda e Bia** que nunca proferiram a mim sequer uma palavra sem um sorriso no rosto e o coração repleto de carinho. Pela ternura com que sempre se preocuparam comigo e com a Tessinha, pela ajuda ilimitada, Muito Obrigada!

Às funcionárias da FOUSP, que sempre com disposição me ajudaram nos momentos em que precisei durante esta jornada: **Nair Pereira, Néia Barbosa e à Bibliotecária Glauci**.

Aos meus queridos colegas “veteranos” de Pós-graduação, que com muito carinho me receberam, me orientaram, me mostraram o caminho das pedras... **Tatiana Libório, Flávia Pontes, Sérgio Cury, Helder Pontes, Camila Rodini, Patricia Adachi, Serginho, Paulo Braz, Thais Acquafreda, Alexandre Fraige e Paulo Sérgio**. Obrigada pelo apoio!

Aos meus queridos colegas “de turma” que juntos dividimos anseios, dúvidas e tarefas e juntos crescemos e aprendemos, e juntos esperamos a chegada da Tessinha... **Brunno, Fernandinha, Fábio Coracin, Kívia, Marina, Yonara, Roberto, Renata, Juliana e Alexandra**. Obrigada pelo convívio, pelas brincadeiras, pelo carinho!

Ao **Prof. Dr. Fabricio Luscino Alves de Castro**, do Instituto de Ciências da Saúde da UNIP, agradeço dela total disponibilidade para o planejamento e trabalho estatístico deste estudo.

À minha primeira orientadora, hoje minha grande amiga, **Profª. Drª. Maria Amélia Gonçalves de Ávila**, pelo incentivo e confiança sempre, pela amizade, pelos conselhos, muito obrigada!

À minha família que me permitiu esta oportunidade de engrandecimento profissional sempre me apoiando, me dando o suporte, compreendendo minha ausência e me permitindo estar longe, mas com tranqüilidade. Agradeço a meus pais, Edilton e Regina, meu esposo Leandro e minha linda Tessinha!

"A grande dificuldade na vida não é fazer esforço,

mas fazê-lo constantemente.

Querer com energia sempre,

eis a condição indispensável ao êxito.

Talvez mesmo a única condição necessária"

Forsegrive

Botelho TL. Expressão por imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina em carcinomas epidermóides bucais em correlação com características clínicas e prognóstico [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

Das neoplasias malignas que ocorrem na boca, 95% são representados pelo Carcinoma Epidermóide Bucal. Esta é uma doença usualmente agressiva, com comportamento biológico imprevisível e prognóstico desfavorável sendo a infiltração local e consequente emissão de metástases a principal causa de morte dos pacientes. A identificação de marcadores moleculares que possam predizer o curso clínico da doença, orientar a determinação do tratamento, bem como conduzir o desenvolvimento de novas terapias que melhorem os índices de sobrevida, tem sido o objetivo de inúmeras pesquisas. O presente estudo procurou determinar a correlação da expressão imunoistoquímica da c-erbB-2 e vimentina com características clínicas da neoplasia e o prognóstico dos pacientes a partir da análise retrospectiva de 65 casos de Carcinoma Epidermóide Bucal. c-erbB-2 e vimentina estavam expressos em 61,54% e 70,8% das amostras analisadas, respectivamente. Não foi observada correlação estatisticamente significante entre a expressão destes marcadores e as características clínicas avaliadas, porém houve uma tendência à expressão imunoistoquímica da vimentina em relação ao índice N. Quanto à sobrevida dos pacientes, esta foi influenciada pelo gênero dos pacientes, hábito de fumar cigarro, estádio clínico da doença, índice N e modalidade de tratamento submetido, sendo o gênero o único fator prognóstico independente

detectado. A expressão imunoistoquimica da c-erbB-2 e vimentina não se demonstraram preditivos de sobrevida em carcinomas epidermóides de boca.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide; prognóstico; vimentina; erbB-2

Botelho TL. Protein expression by immunohistochemistry of c-erbB-2 and vimentin in oral squamous cell carcinoma correlated with clinical features and prognosis [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

About of malignancies in oral mucosa, 95% are represented by oral squamous cell carcinoma (OSCC). This disease is usually aggressive, with unpredictable biological behavior and poor prognosis and the local infiltration and consequent metastases the main cause of death of patients. The identification of molecular markers that may predict the clinical course of disease, guide the treatment as well as lead the development of new therapies that improve the rates of survival, has been the goal of many studies. This study examined the correlation of immunohistochemical expression of c-erbB-2 and vimentin with clinical features and prognosis of OSCC patients from the retrospective analysis of 65 cases. c-erbB-2 and vimentin were expressed in 61.54% and 70.8% of samples, respectively. There was no statistically significant correlation between the expression of these markers and clinical characteristics, but a tendency to vimentin expression in the lymph node status. The patients survival, was influenced by their gender, smoking habits the, clinical stage of disease, N index and modalities of treatment. The gender was the only independent prognostic factor detected. The immunohistochemical expression of c-erbB-2 and vimentin did not show up predictive of survival in oral cavity squamous cell carcinoma.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; prognosis; vimentin; erbB-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Representação esquemática simplificada da estrutura dos receptores ErbB.....35

Figura 2.2 Representação esquemática simplificada das vias de transmissão de sinal celular durante a transição epitélio mesenquimal.....42

Figura 5.1 Expressão imunoistoquímica da proteína c-erbB-2 (estreptavidina-biotina).....57

Figura 5.2 Expressão imunoistoquímica da proteína Vimentina (estreptavidina-biotina).....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Características clínicas dos pacientes avaliados no estudo.....55

Tabela 5.2 Correlação entre a expressão imunoistoquímica da Vimentina e c-erbB-2 com os dados clínicos dos pacientes avaliados no estudo.....59

Tabela 5.3 Teste qui-quadrado para avaliação da correlação entre as categorias das variáveis de imunoexpressão de Vimentina e c-erbB-2 60

Tabela 5.4 Análise da correlação entre a imunoexpressão da Vimentina e do c-erbB-2 utilizando o Teste de Spearman.....61

Tabela 5.5 Análise do quadro vital dos 65 pacientes avaliados no estudo.....62

Tabela 5.6 Teste do *log-rank* para as curvas de sobrevida representativas de cada um dos fatores avaliados no estudo.....63

Tabela 5.7 Modelo de riscos proporcionais de Cox para avaliação do efeito de cada uma das variáveis consideradas significantes pela análise univariada.....68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os 65 indivíduos avaliados neste estudo.....62

Gráfico 5.2 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos do sexo masculino e feminino obtidos da amostra de 65 pacientes estudados.....64

Gráfico 5.3 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tabagistas e não tabagistas obtidos da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....64

Gráfico 5.4 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos com tumores diagnosticados com estágio N negativo e N positivo, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....65

Gráfico 5.5 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos com tumores com estadiamento clínico I+II e III+IV, obtidos da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....65

Gráfico 5.6 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tratados cirurgicamente e não cirurgicamente, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....66

Gráfico 5.7 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para amostras com expressão positiva ou negativa da proteína Vimentina, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....66

Gráfico 5.8 Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para amostras com expressão positiva ou negativa da proteína c-erbB-2, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC do Inglês "American Joint Committee on Cancer"

CEB Carcinoma Epidermóide de Boca

EGF do Inglês "epidermal growth factor"

HER2 do Inglês "Human Epidermal growth factor Receptor-type 2"

OMS Organização Mundial de Saúde

TNM estadiamento TNM, T= tumor; N= linfonodos e M= metástases

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO..... 18

2 REVISÃO DA LITERATURA..... 20

2.1 Carcinoma epidermóide de boca..... 20

2.1.1 Fatores prognósticos..... 23

2.2 c-erbB-2..... 33

2.3 Vimentina..... 40

3 PROPOSIÇÃO..... 45

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 46

4.1 População de estudo e seleção das amostras...... 46

4.1.1 Critérios de inclusão..... 46

4.1.2 Critérios de exclusão..... 47

4.2 Dados clínicos coletados..... 48

4.3 Técnica de imunoistoquímica..... 49

4.4 Avaliação da expressão imunoistoquímica..... 51

4.5 Análise estatística dos resultados..... 52

5 RESULTADOS..... 55

5.1 Caracterização da amostra..... 55

5.2 Expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina..... 56

5.2.1 Correlação com características clínicas..... 59

5.2.2 Correlação entre si..... 60

5.3 Análise de sobrevida global..... 61

5.3.1 Correlação com características clínicas e expressão imunoistoquimica das proteínas c-erbB-2 e vimentina..... 63

5.3.2 Análise de fatores prognósticos independentes..... 68

6 DISCUSSÃO..... 70

7 CONCLUSÕES..... 82

REFERÊNCIAS..... 83

APÊNDICES..... 94

ANEXOS..... 97

1 INTRODUÇÃO

Considerado um sério e crescente problema de saúde pública em muitas partes do mundo, o Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB) é uma neoplasia epitelial maligna agressiva, freqüentemente associada a um prognóstico ruim. Com índices de sobrevida estáveis nas últimas décadas, esta permanece como uma doença letal para mais de 50% dos pacientes diagnosticados, apesar das opções terapêuticas disponíveis atualmente (VAIRAKTARIS et al., 2008; WARNAKULASURIYA, 2009).

O diagnóstico precoce permanece como um fator prioritário para melhores índices de sobrevida. Porém, a facilidade de acesso para inspeção visual e a possibilidade de biópsias em qualquer estágio da doença não altera a realidade em que a maioria dos casos são diagnosticados em estágios avançados da doença comprometendo em muito o prognóstico dos pacientes (ARDUINO et al., 2008).

Acredita-se que a sobrevida limitada deve-se além do diagnostico tardio, à falta de marcadores de detecção precoce e à não identificação de fatores prognósticos que permitam a predição de agressividade tumoral e a individualização do tratamento (MOLINOLO et al., 2009; SAWYERS, 2008; SPECENIER; VERMORKEN, 2007).

Atualmente, o estadiamento clínico TNM, a profundidade de invasão tumoral ou espessura do tumor e a gradação histológica de malignidade permanecem como os principais indicadores prognósticos utilizados para o planejamento terapêutico inicial e predição do curso da doença. Entretanto, muitas vezes o valor prognóstico destes parâmetros clínico-patológicos parece ser incerto e controverso e nesse contexto se inserem os estudos que buscam biomarcadores moleculares de comportamento e agressividade tumoral (ARDUINO et al., 2008; SALOMÃO, 2003).

A avaliação de genes e proteínas envolvidas nos diversos eventos do processo de carcinogênese oral, a exemplo de outros sítios anatômicos, demonstra-se como um caminho promissor para a definição de indicadores que possam contribuir na predição do curso da doença. Além disto, suscitam a possibilidade de desenvolvimento de estratégias terapêuticas menos agressivas. O que melhoraria a qualidade de vida e conseqüentemente a sobrevida dos pacientes (SCULLY; BAGAN, 2009a).

Neste sentido, estudos que avaliem a correlação entre a expressão por imunoistoquímica de proteínas que induzam o aumento da proliferação celular ou que levem à capacidade de invasão e metástases, em associação com dados clínicos e de seguimento de pacientes com CEB têm se demonstrado como um caminho promissor para a identificação de biomarcadores prognósticos (AGUIAR; KOWALSKI; ALMEIDA, 2007; CAMISASCA et al., 2009; COSTA et al., 2007; LEE et al., 2009; MUÑOZ-GUERRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

A partir da análise retrospectiva de casos de carcinoma epidermóide primário de língua, assoalho de boca e outros sítios da cavidade oral, propusemo-nos a avaliar a expressão por imunoistoquimica das proteínas c-erbB-2 e vimentina nas amostras tumorais e correlacioná-la com o estadiamento clínico, a localização da neoplasia, fatores prognósticos clínicos usualmente reconhecidos e a sobrevida dos pacientes considerando diferentes modalidades de tratamento. Foi verificado ainda se existe correlação da imunoexpressão destas proteínas nos espécimes analisados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

O Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) também chamado carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas representa cerca de 95% das neoplasias malignas da boca. Apresenta-se entre a 6ª e 8ª neoplasia que com maior frequência afeta o corpo humano e compreende as neoplasias de lábio e cavidade oral (mucosa bucal, gengiva, palato duro, língua e assoalho da boca) (ARDUINO et al., 2008; SPECENIER; VERMORKEN, 2007).

O risco de desenvolvimento do CEB aumenta com a idade e a maioria dos casos ocorre em pessoas com 50 anos ou mais. Observa-se maior incidência em homens do que em mulheres tendo a diferença entre os sexos diminuído nas últimas décadas. Atualmente esta proporção encontra-se em 1.5 homem:1 mulher. A mudança de hábitos sociais como o maior consumo de álcool e a adesão ao tabagismo, tem explicado sua incidência crescente em mulheres e pacientes jovens. Com taxas de incidência e mortalidade aumentadas nas últimas décadas, o CEB é um sério e crescente problema de saúde pública em muitas partes do mundo, com cerca de 275.000 novos casos diagnosticados e 8.000 mortes anuais em conseqüência da doença, sendo dois-terços destes casos observados em países desenvolvidos (WARNAKULASURIYA, 2009).

No Brasil, em 2008 e 2009 estima-se a detecção de 14.160 novos casos de câncer de cavidade oral, sendo a sétima localização primária mais freqüente

correspondendo a 6% do total de casos de câncer no país (BRASIL, 2007).

A língua é o sítio anatômico acometido com maior frequência pelo carcinoma epidermóide de cavidade oral representando 40-50% dos casos, mas cada sítio apresenta particularidades para o seu manejo, sendo comum o comprometimento por invasão em áreas contíguas (SEVERINO et al., 2008).

O fumo do tabaco e o consumo intenso de álcool são provavelmente os mais conhecidos fatores de risco ligados à carcinogênese oral, no entanto, a predisposição genética e a pesquisa de outros possíveis fatores de risco também têm sido sugeridos pelo fato da maioria da população exposta a estes fatores não desenvolver a doença, e cerca de 4%-10% dos pacientes com CEB terem menos de 40 anos e não serem tabagistas ou etilistas crônicos (PETERSEN, 2009; VAIRAKTARIS et al., 2008).

A ressecção cirúrgica associada ou não ao esvaziamento cervical permanece como a forma de tratamento inicial melhor estabelecida para o CEB. Esta pode ser acompanhada de radioterapia, como tratamento adjuvante, quando as margens cirúrgicas encontram-se comprometidas ou suspeita-se de metástase para linfonodos regionais. A indicação da modalidade cirúrgica é usualmente definida pela localização e tamanho do tumor, proximidade a bases ósseas e infiltração aos tecidos adjacentes. Nos casos inoperáveis por inacessibilidade cirúrgica do tumor ou pela morbimortalidade inerente ao procedimento, o tratamento radioterápico associado à quimioterapia tem sido sugerido com melhora significativa da qualidade de vida e sobrevida global (AGUIAR; KOWALSKI; ALMEIDA, 2007; ARDUINO et al., 2008; JEREMIC; MILICIC, 2009; ROGERS et al., 2009; SCULLY; BAGAN, 2009a).

O CEB tem como célula de origem o queratinócito oral e assim como outros cânceres é resultado de uma série de etapas distintas, caracterizadas pelo acúmulo seqüencial de defeitos genéticos somados, seguidos de sua expansão clonal

(NAGPAL; DAS, 2003). Alterações cromossômicas com mudanças em mais de 100 genes têm sido descritas (VEIGA et al., 2003). Esta instabilidade genômica pode acarretar alterações na divisão, diferenciação e morte celular e consequente determinação de um fenótipo maligno ao queratinócito inicialmente normal. O prolongamento do tempo de vida da célula possibilitando o acúmulo de múltiplas alterações genéticas parece ser um processo importante na etapa inicial da carcinogênese (BAGAN; SCULLY, 2009; MOLINOLO et al., 2009; SCULLY; BAGAN, 2009b).

Hanahan e Weinberg (2000) sugerem seis alterações essenciais na fisiologia celular para a determinação do fenótipo maligno, são elas: Auto-suficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, desenvolvimento da angiogênese mantida, capacidade para invadir e metastatizar e instabilidade genômica resultando em defeitos no reparo do DNA, esta última também conhecida como fenótipo mutante dos tumores sólidos. Estas alterações foram posteriormente discutidas por Loeb, Loeb e Anderson (2003).

Embora estudos já tiverem identificado anormalidades genéticas presentes em neoplasias de cabeça e pescoço de maneira geral, ainda não existe um perfil genético estabelecido. A amplificação gênica e a superexpressão protéica também parecem estar associadas principalmente pela superexpressão ou super-atividade de genes que estimulam a proliferação celular, os oncogenes, e/ou inativação de genes que controlam a proliferação, os genes supressores tumorais. (VAIRAKTARIS et al., 2008).

O CEB permanece como uma doença letal para mais de 50% dos pacientes diagnosticados. Talvez o do caráter assintomático da lesão principalmente em

estágios precoces contribua para que a maioria dos pacientes apresente-se em estágio avançado da doença no momento do diagnóstico inicial apesar da facilidade de acesso para a inspeção visual (WARNAKULASURIYA, 2009).

Para Molinolo et al. (2009) a sobrevida limitada de pacientes com CEB deve-se também à falta de indicadores de detecção precoce da doença e à falha a resposta aos tratamentos quimioterápicos disponíveis.

A não identificação de fatores prognósticos que permitam a individualização do tratamento assim como a morbidade do tratamento usualmente preconizado, também são consideradas causas da manutenção dos baixos índices de sobrevida (CHIN et al., 2005; SAWYERS, 2008; SPECENIER; VERMORKEN, 2007; VAIRAKTARIS et al., 2008).

Na última década, várias pesquisas na área de biologia celular e molecular tem sido desenvolvidas a procura de novos recursos para pacientes com câncer, porém ainda são poucos os retornos aplicáveis ao CEB (ARDUINO et al., 2008; VAIRAKTARIS et al., 2008).

2.1.1 Fatores Prognósticos

A busca por fatores prognósticos que orientem a determinação do tratamento inicial apropriado, de maneira individual em função do comportamento biológico potencial das lesões, tem mobilizado muitos centros de pesquisa e tratamento do câncer nos últimos anos (CAMISASCA et al., 2009; FRANCHI et al., 2009; MASSANO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

A identificação de fatores prognósticos que demonstrem expectativas realistas de evolução da doença poderia contribuir para o melhor entendimento da progressão neoplásica e conseqüentemente na identificação precoce de lesões suspeitas de malignidade e no futuro desenvolvimento de novas opções terapêuticas com menor morbidade (LAIMER et al., 2009; PATEL et al., 2009).

O curso clínico de pacientes com CEB é influenciado por fatores específicos do tumor primário, características do hospedeiro e naturalmente pelo tipo de tratamento aplicado (ARDUINO et al., 2008; MASSANO et al., 2006).

Atualmente, o estadiamento clínico, a profundidade de invasão tumoral ou espessura do tumor e a gradação histológica permanecem como os principais indicadores prognósticos utilizados para o planejamento terapêutico inicial, controle pós-operatório e predição do curso da doença. Consideram-se maiores as chances de metástase quanto maiores forem os tumores primários, menos diferenciados histologicamente e que cresçam com mais rapidez. Entretanto, muitas vezes o valor prognóstico destes parâmetros clínico-patológicos parece ser incerto e controverso (ARDUINO et al., 2008; SALOMÃO, 2003).

O estadiamento clínico dos carcinomas, utilizado universalmente, é realizado através das recomendações do sistema TNM desenvolvido entre os anos de 1943 a 1952 por Pierre Denoix e a UICC (União Internacional Contra o Câncer) para classificação dos tumores malignos. No sistema TNM são considerados: O maior diâmetro da lesão e o comprometimento de estruturas adjacentes (T1-4), as evidências de metástases para linfonodos (N0-3) e presença de metástases a distância (M0-1) sendo as classificações consideradas Tx, Nx ou Mx quando estas informações não puderam ser identificadas. Esta classificação foi reformulada e denominado Manual para Estadiamento do Câncer em 1987 juntamente com o AJCC

(American Joint Committee on Cancer) a partir do agrupamento das possíveis combinações TNM com comportamento clínico semelhante, em estágios de 0 a IV. O estadiamento clínico tumoral segue critérios definidos que utilizam informações obtidas por meio de exame físico minucioso associado ou não a exames por imagem (cTNM) ou exame histopatológico (pTNM). Muitos autores o consideram falho como indicador prognóstico isolado para o CEB (LIAO et al., 2007).

Para Van der Schroeff e Baatenburg de Jong (2009), o estadiamento TNM facilita a comunicação e a divulgação de dados além de permitir a avaliação uniforme em diferentes centros de tratamento do câncer, no entanto, apresenta algumas limitações importantes como:

- É baseado no prognóstico presuntivo e não prospectivo;
- Apresenta variações inter e intra-observadores;
- É susceptível a variações dependendo dos recursos de diagnóstico utilizados (por exemplo, inclusão ou não de exames por imagem);
- Avalia a morfologia tumoral pelo seu maior diâmetro independente da lesão ser exofítica ou endofítica;
- É atribuído estaticamente, no momento do diagnóstico ou na análise da peça cirúrgica, não levando em consideração fatores prognósticos dinâmicos paciente-dependentes como idade, co-morbidade, resposta ao tratamento ou comportamento biológico tumoral;

Entretanto, outros trabalhos têm demonstrando uma forte correlação entre o estádio clínico TNM e a sobrevida dos pacientes com CEB (ARDUINO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2008; CLARK, 2006).

Apesar desta divergência, a grande maioria dos autores afirma que o plano de tratamento inicial é influenciado diretamente pelo estádio clínico da doença no

momento do diagnóstico (ARDUINO et al., 2008; CLARK, 2006; LIAO et al., 2007; VAN DER SCHROEFF; BAATENBURG DE JONG, 2009).

A predileção pela via linfática é característica dos carcinomas e acredita-se que esta possa significar ainda uma barreira à progressão tumoral hematogênica visto que a atuação do sistema imune pode propiciar uma resposta específica contra o tumor e a destruição celular. Assim como as numerosas anastomoses entre os sistemas linfático e vascular podem explicar as metástases em “salto”, quando ocorrem metástases à distância com preservação dos linfonodos regionais (SUGIURA et al., 2009).

Sem dúvida, a presença de metástases para linfonodos cervicais é universalmente considerada um dos maiores indicadores prognósticos no CEB, sendo fortemente correlacionado com baixa sobrevida e recorrência local muitas vezes precoce (MASSANO et al., 2006).

Os tumores com menos de 2 cm de diâmetro e que não apresentam metástases linfonodais ou à distância têm taxa de sobrevida de 5 anos de aproximadamente 85% enquanto neoplasias com mais de 4 cm com metástases em linfonodos detectáveis clinicamente em mais de um nível ou metástases à distância têm a sobrevida reduzida para cerca de 9% em 5 anos (PANIZZA, 2009).

Os CEB produzem metástases, em primeira instância, preferencialmente para os níveis I e II cervicais, o que envolve as cadeias submandibulares, digástrica e jugulocarotídea. O grande problema é que dos casos identificados como livres de metástase regional a partir do exame clínico e/ou radiográfico (cN0), 20%-40% apresentam invasão neoplásica detectáveis apenas ao exame histopatológico (pN+) denominadas metástases ocultas (BYERS et al., 1998).

Na ausência de metástases para linfonodos detectáveis clinicamente, a

espessura tumoral emerge como um importante fator preditivo de metástases ocultas, particularmente em estágios precoces da doença (T1 e T2) e norteiam o tratamento dos linfonodos relacionados. (MASSANO et al.; 2006).

Patel et. al. (2009) avaliaram 251 espécimes de ressecção cirúrgica de carcinoma epidermóide de cavidade oral de diferentes sítios e constataram que a avaliação da espessura tumoral nas peças cirúrgicas demonstrou-se como um fator significante de predição de sobrevida, principalmente quando superiores a 5 mm. Cerca de 36% dos pacientes avaliados clinicamente como N0 apresentavam metástases ocultas quando da avaliação dos espécimes de dissecção cervical. Apesar deste alto índice de metástases ocultas, os autores sugerem o esvaziamento cervical seletivo dos níveis I a III como rotina nos casos N0 a partir de 2 mm de espessura e apenas recomendam a inclusão dos níveis IV e V apenas nos casos com evidência clínica de doença metastática nos outros níveis.

Entretanto, estudos que investiguem o papel da espessura tumoral no manejo terapêutico do pescoço têm demonstrado ampla variabilidade clínica, provavelmente pela falta de padronização de como esta medida deve ser tomada. Consequentemente este fator prognóstico universalmente reconhecido não tem o impacto clínico esperado por não fazer parte da rotina de determinação do plano de tratamento do paciente (LEEMANS et al., 1994; MADDOX, 1984).

Woolgar (2006) aponta como falha a coleta de dados histopatológicos de peças cirúrgicas de CEB em diferentes serviços de anatomia-patológica, o que impede a ampliação de amostras para maior fidelidade dos resultados em estudos multicêntricos. O autor sugere a utilização de um formulário padrão para a coleta de dados incluindo a padronização da medida de espessura tumoral.

Para Woolgar e Triantafyllou (2009) devido à dificuldade da avaliação da espessura tumoral e consequente caráter subjetivo desta avaliação os autores sugerem que esta deveria ser realizada diferenciando lesões ulceradas das lesões proliferativas.

O sítio anatômico tem demonstrado resultados divergentes quanto à correlação com a sobrevida dos pacientes. Para Shaw et al. (2008) a localização anatômica do tumor primário apresenta-se significativamente relacionada à sobrevida global do paciente. No entanto, alguns autores não observaram esta correlação (OLIVEIRA et al., 2008; SEVERINO et al., 2008).

van der Schroeff e Baatenburg de Jong (2009) sugerem que lesões localizadas no palato duro e gengiva superior tendem a crescer localmente em extensão e profundidade, destruindo o osso palatino e apresentando apenas tardiamente metástases regionais, ao passo que, no terço inferior da face, os tumores têm maiores índices de metástase mesmo em estágios iniciais da doença.

Alguns autores não atribuem diferenças prognósticas entre os múltiplos locais da cavidade oral devido a variações epiteliais ou de desenvolvimento local, mas acreditam que em virtude da complexidade das vias linfáticas inerente a cada sítio anatômico, regiões com vasta rede de drenagem tendem a apresentar a um maior índice de metástases e conseqüente piora no prognóstico. Além disto, dependendo do local da lesão, a aparência clínica pode influenciar na detecção dos sinais precoces da doença o que levaria ao diagnóstico apenas em estágios mais avançados (MASSANO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2008).

Para Jeremić e Miličić (2009), a maioria dos pacientes com CEB apresenta-se no momento do diagnóstico com a doença em estágio avançado locoregional (estágio

III-IV) mas sem metástases à distância (M0). O que para Goy et al. (2009) não é necessariamente consequência de atraso diagnóstico.

Atraso diagnóstico deve ser considerado como o período total de tempo entre a percepção dos sinais e sintomas e a determinação do diagnóstico sendo dividido em duas fases distintas: da manifestação inicial dos sintomas à procura por cuidados profissionais de saúde como atraso do paciente, e o período entre o primeiro contato com profissional especializado e o diagnóstico definitivo como atraso profissional (PORTA; FERNANDEZ; ALGUACIL; 2003).

A partir de uma revisão sistemática Goy et al. (2009) concluíram que o atraso diagnóstico (tanto do paciente quanto o profissional) é comum em cânceres de cabeça e pescoço, no entanto, consideram equivocado o uso do estadiamento clínico para identificação do significado prognóstico do atraso do paciente e/ou profissional. Para os autores, tumores com mesmo estadiamento podem ter manifestações clínicas e tempo de evolução diferentes como conseqüência de comportamentos biológicos distintos, e sugerem o atraso diagnóstico como um fator prognóstico difícil de ser avaliado isoladamente.

O CEB apresenta algumas variações no padrão histopatológico, sendo classificado em carcinoma epidermóide convencional, verrucoso, basalóide e outros subtipos mais comuns em outros sítios da região de cabeça e pescoço como laringe e hipofaringe. Para Pereira et al. (2007), o comportamento biológico e o prognóstico associado aos subtipos histológicos verrucoso e basalóide não estão completamente comprovados, provavelmente em virtude da sua baixa freqüência. Por outro lado, muitas variantes são diagnosticadas equivocadamente devido ao espécime de biópsia não ser adequadamente representativo. Segundo os autores, múltiplos espécimes de áreas diferentes do tumor devem ser obtidos para o correto diagnóstico do subtipo

histológico.

A invasão perineural também tem sido utilizada como indicador histológico de prognóstico desfavorável em neoplasias malignas, sendo correlacionada a estágios avançados de invasão local. Porém para Woolgar (2006) esta definição depende do sítio anatômico acometido e da espessura tumoral para ser considerado fator indicativo de processo metastático precoce.

Outro fator histopatológico avaliado, mas que comumente associa-se à agressividade tumoral é a graduação histológica de malignidade, sugerida inicialmente por Broder em meados de 1920, modificada subsequentemente e atualmente adotada pela Organização Mundial de Saúde. Esta sugere a classificação dos CEB em graus I, II ou III de diferenciação celular, das lesões bem diferenciadas para as menos diferenciadas respectivamente, implicando teoricamente na identificação de lesões de baixo grau de malignidade a alto grau de malignidade (WOOLGAR, 2006).

Há muito se sugere que este índice de diferenciação histológica esteja correlacionado diretamente ao prognóstico dos pacientes. Entretanto, algumas discrepâncias têm sido observadas e a agressividade tumoral é muitas vezes variável e independente da graduação histológica de malignidade.

Albuquerque et al. (2003) observaram após estudo comparativo de 42 casos de CEB que uma mesma neoplasia pode apresentar padrões de diferenciação variáveis dependendo da área avaliada e sugeriram portanto que a análise apropriada do padrão histológico do tumor deve ser realizada considerando toda a fronteira de invasão tumoral.

Segundo Arduino et al. (2008) embora muitos fatores prognósticos sejam bem relatados na literatura, poucos estudos têm analisado o curso clínico de pacientes tratados de diferentes formas, com o objetivo de identificar fatores que possam afetar

a sobrevida. Em um estudo retrospectivo de 334 casos de CEB, encontraram relação estatisticamente significante entre a gradação histológica de malignidade, o estadiamento clínico e a sobrevida dos pacientes, sugerindo que estes sejam marcadores prognósticos isolados. Porém, afirmaram que a avaliação de espécimes de biópsias pequenos de tumores histologicamente heterogêneos, são as principais falhas deste recurso como fator preditivo de agressividade tumoral e assim como Pereira et al. (2007) e Pinto Jr (1991) recomendam a classificação histológica apenas em peças cirúrgicas de ressecção.

Woolgar et al. (2006) ressaltam ainda que a natureza subjetiva da avaliação e o alto índice de neoplasias classificadas como moderadamente diferenciadas, cerca de 90%, são fatores adicionais que contribuem para as falhas deste recurso como um indicador prognóstico confiável.

Woolgar e Triantafyllou (2009) complementaram ainda que para a graduação histológica ser preditiva da agressividade tumoral é importante que seja complementada com informações a cerca do padrão de invasão e descrevem 4 tipos possíveis de acordo com o nível de coesão e arranjo tecidual das células tumorais. Para a identificação do padrão de invasão, os autores sugerem que esta até pode ser realizada em biópsias incisionais desde que o espécime tenha tamanho e profundidade suficientes para envolver pelo menos o fronte lateral de invasão.

Bryne (1998) já havia ressaltado o fronte de invasão como a área mais importante para a previsão prognóstica em carcinomas orais, porém considera esta avaliação possível apenas com a inclusão da margem profunda de invasão tumoral e somente em peças cirúrgicas.

A exemplo do que ocorre em outros carcinomas humanos (MATSUO et al., 2004; ROSS et al., 2004; YASUI et al., 2005), muitas pesquisas no âmbito da biologia

celular e molecular buscam identificar marcadores biológicos também chamados biomarcadores que possam ser utilizados de maneira efetiva na predição da agressividade tumoral do CEB (AGUIAR et al., 2007; CHIN et al., 2005; LAIMER et al., 2009; SUGIURA et al., 2009; UEHARA et al., 2009).

A definição destes biomarcadores poderia ainda viabilizar o desenvolvimento de uma nova geração de fatores preditivos de tratamento com terapias mais específicas e consequente expectativa de menores efeitos colaterais (MANNE; SRIVASTAVA;SRIVASTAVA, 2005).

Muito se discute na literatura a cerca da identificação destes biomarcadores do câncer e Sawyers (2008) ressalta a importância de classificá-los em três tipos específicos: biomarcadores prognósticos, preditivos ou farmacodinâmicos. Marcadores prognósticos são aqueles capazes de sugerir o curso clínico individual da doença, diferenciando entre o mais agressivo e o menos agressivo. Usualmente são testes de expressão multigênica que podem ser úteis na decisão de uma abordagem terapêutica primária mais agressiva ou na indicação de terapias adjuvantes. Biomarcadores preditivos ou marcadores de resposta são aqueles que identificam pacientes que possam se beneficiar com um tipo específico de tratamento. Por fim, marcadores farmacodinâmicos são os capazes de mensurar os efeitos de uma determinada droga no tumor e no hospedeiro, podendo ser utilizado para se determinar doses terapêuticas individualmente ou ainda padronizar as doses de novas drogas antineoplásicas em estágios precoces de desenvolvimento clínico.

O estudo do ciclo celular relacionado ao câncer tem despertado interesse de numerosos pesquisadores, pois no processo de proliferação celular estão envolvidas proteínas que podem provocar o aumento da proliferação, a perda da adesão celular, invasão local e conseqüentemente metástases (GUERRA et al., 2005).

Diversos genes supressores tumorais, oncogenes e moléculas de adesão, têm sido estudados como possíveis biomarcadores para que uma vez identificados possam orientar de forma precisa e individualizada a extensão da abordagem cirúrgica inicial, fornecendo melhor oportunidade de cura, com prolongamento da sobrevida e consequentemente melhor qualidade de vida aos pacientes (LEE et al., 2009; MASSANO et al., 2006; MUÑOZ-GUERRA et al., 2005).

Como muitos pacientes com CEB utilizam a radioterapia como tratamento adjuvante na prevenção de recidivas locais e metástases regionais, Glazer et al. (2009) ressaltam o papel de indicadores biológicos que possam oferecer benefício clínico como marcadores terapêuticos preditivos de radiossensibilidade. Neste sentido, o receptor EGFR é um dos oncogenes mais estudados tendo demonstrado aplicabilidade clínica com bons resultados em carcinomas de mama.

2.2 c-erbB-2

Na busca do maior entendimento da carcinogênese e consequentemente identificação de melhores marcadores biológicos, muita atenção tem sido focada no papel dos fatores de crescimento e seus receptores.

Os receptores tirosino-quinase são enzimas alostéricas de superfície celular, que existem tanto na forma de monômeros quanto dímeros e apresentam um domínio trans-membrana único, separando um domínio quinase intracelular de um domínio extracelular de acoplamento do ligante, cuja função é ativar a sinalização intracelular em resposta a um sinal extracelular. A interação entre o receptor e o seu

fator de crescimento provoca uma mudança na conformação do domínio extracelular de inativo para ativo e induz a sua homo ou heterodimerização. Esta levando a um aumento da atividade quinase e autofosforilação dos resíduos de tirosina e subseqüente recrutamento de proteínas-alvo que iniciam uma complexa cascata de sinalização celular que resulta na proliferação celular, crescimento, diferenciação, migração, adesão, transformação ou morte celular (BLUME-JENSEN;HUNTER 2001).

A família de proteínas c-erbB tem seu nome originado em homologia ao produto gênico da eritroblastose viral, v-erbB. As proteínas c-erbB formam um complexo de receptores tirosino-quinase tipo I chamados receptores ErbB ou HER. São eles o ErbB-1 ou EGFR, ErbB-2/HER 2, ErbB-3/HER 3 e ErbB-4/HER 4. São conhecidos mais de 30 ligantes dos receptores ErbB, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação de crescimento-α (TGF-α), ampirregulina, betacelulina, dentre outros. Estes ligantes são moléculas sinalizadoras, em sua maioria fatores de crescimento, capazes de induzir a dimerização do receptor ErbB e consequentemente iniciar atividade sinalizadora intracelular. Dependendo do ligante, devido à possibilidade de combinações os receptores ErbB podem formar 4 homodímeros ou 6 heterodímeros. A heterodimerização aumenta a diversidade de ligantes reconhecidos pelos receptores individuais o que permite o recrutamento de diferentes moléculas que ativam diferentes vias de sinalização (RUBIN; YARDEN, 2001)

Atualmente os receptores ErbB constituem uma das vias de transmissão de sinal celular mais amplamente estudada em virtude da sua ativação desencadear diferentes vias de sinalização intracelulares, como a via da RAS-RAF-MAPK e da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) (HUTCHINSON et al., 2004). A RAS-RAF-

MAPK (proteína quinase mitógeno ativado) são um grupo de serina-treonina quinases que regulam a proliferação celular e migração no câncer. A PI3K/AKT também é uma serina-treonina quinase que através de várias etapas intermediárias age sobre os fatores de transcrição no núcleo, regulando as vias de sinalização da apoptose, expressão gênica e proliferação celular no câncer. A estrutura de cada um dos receptores, seus ligantes principais e as vias de sinalização interrelacionadas estão ilustradas na Figura 2.1 (IBRAHIM et al., 1997).

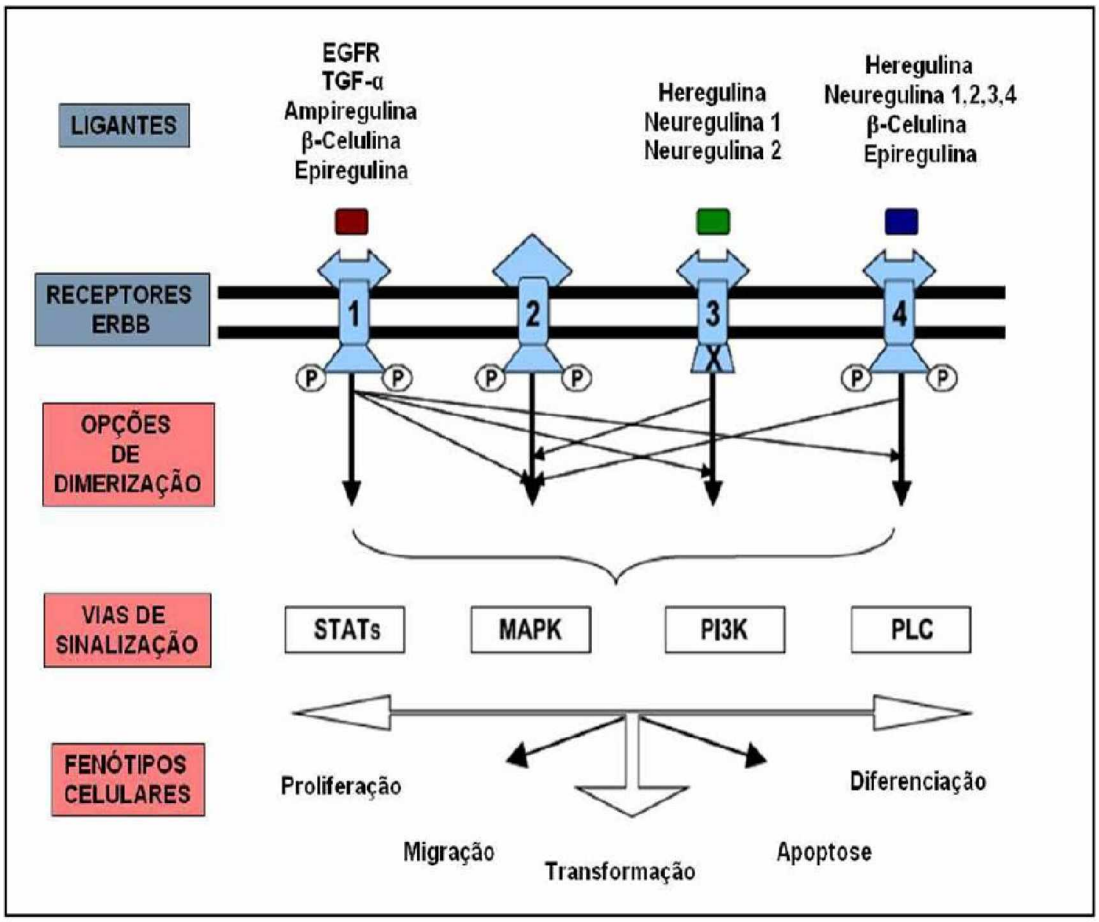

Figura 2.1 – Representação esquemática simplificada da estrutura dos receptores ErbB adaptado de Ibrahim et al. (1997)

Nas células tumorais, os receptores ErbB são ativados por diversos mecanismos, incluindo a mutação, a superexpressão e produção autócrina e parácrina de fatores de crescimento. Tanto a superexpressão quanto a alteração

estrutural dos receptores ErbB são encontrados em diversas neoplasias (CITRI et al., 2002). A mutação mais comumente observada é a deleção de parte do domínio extracelular, o que torna o receptor estruturalmente ativo.

Cada um dos receptores ErbB apresenta um grupo de ligantes específicos, no entanto, nenhum ligante ErbB-2-específico foi identificado até o momento. Este é extremamente semelhante ao receptor EGFR em seu domínio intracitoplasmático e apresenta-se como o par preferencial para a heterodimerização dos outros receptores ErbB. O ErbB-2 é o único receptor que possui uma conformação de domínio extracelular fixa, e que remete à forma ativa mesmo na ausência de um ligante, sendo o parceiro preferido na formação de heterodímeros. Os heterodímeros contendo o ErbB-2 são relativamente mais potentes e mantém a ativação celular por mais tempo. Acredita-se que o ErbB-2 aumente a capacidade transformante de outros receptores da família ErbB e por isto seja o grande regulador do grupo de receptores (RUBIN; YARDEN, 2001).

A proteína c-erbB-2, também chamada HER 2-neu ou erbB2 é uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosino-quinase, com 1255 aminoácidos e 185 Kda codificada pelo gene *erb*B-2, um proto-oncogene situado no cromossomo 17q21, originalmente identificado em tumores neuroectodérmicos de ratos como neuroblastomas e glioblastomas (GSCHWIND; FISHER; ULLRICH, 2004).

Apesar de frequentemente expressa em uma variedade de células e tipos teciduais normais, exceto as de origem hematopoiéticas, desempenhando um papel importante no crescimento e diferenciação celular, em células epiteliais normais, a c-erbB-2 é pouco expressa na superfície celular, tão poucos são os heterodímeros formados e os sinais de crescimento são relativamente fracos e controláveis (RUBIN; YARDEN, 2001).

Para Bei et al. (2001) analisando a expressão imunoistoquímica da c-erbB-2 em mucosa oral normal e em lesões proliferativas benignas, detectou que esta foi pouco observada e quando presente concentrava-se principalmente nas camadas intermediárias do epitélio.

Em contrapartida, sua superexpressão tem sido observada em diversas neoplasias malignas humanas incluindo mama, ovário, próstata e colon, sendo relacionada com menor sobrevida (LONG et al., 2009; RUBIN; YARDEN, 2001).

Quando a c-erbB-2 é superexpressa múltiplos heterodímeros ErbB-2 são formados e a sinalização celular é mais forte, o que resulta em uma maior capacidade de resposta aos fatores de crescimento e consequente proliferação neoplásica, desempenhando este, um papel fundamental na transformação e tumorigênese. Do ponto de vista de sinalização celular, foi relatado por ZACZEK em 2005 que a superexpressão de c-erbB2 desregula a transição G1-S por modular a atividade dos reguladores da fase G1: complexo ciclina E-CDK2, c-Myc, ciclina D e o inibidor p27. O complexo ciclina E-CDK2 é responsável pela entrada no ciclo celular e este pode ser regulado negativamente por diferentes mecanismos incluindo o vínculo com o p27. No entanto, quando o p27 está associado ao c-Myc ou ciclina D, o complexo ciclina E-CDK2 está ativo e inicia a entrada no ciclo celular. A sinalização celular hiperativada pela superexpressão de c-erbB-2 resulta no aumento dos níveis de c-Myc e ciclina D com consequente sequestro de p27, levando à potencialização do complexo ciclina E-CDK2 e intensa atividade de proliferação celular. Isto explica porque a superexpressão de c-erbB-2 é considerada um indicador de mau prognóstico principalmente em cânceres de mama e podem ser preditivos de resposta ao tratamento (RUBIN; YARDEN, 2001; WU et al., 2008).

Estudos que avaliem a superexpressão da c-erbB-2 em carcinomas de cabeça e pescoço como indicador prognóstico são poucos e os resultados demonstrados bastante variáveis.

Parise Junior et al. (2004) verificaram o impacto prognóstico da expressão imunoistoquímica da c-erbB-2 dentre outras proteínas em um estudo prospectivo com 54 casos de carcinoma de cabeça e pescoço e esta foi detectada em 38,9% dos casos porém não verificaram correlação entre a imunoexpressão e a sobrevida dos pacientes.

Silva et al. (2004) avaliaram a expressão imunoistoquímica da c-erbB-2 e outras proteínas em 62 casos de carcinoma epidermóide oral, incluindo 43 casos de cavidade oral e 19 de orofaringe, e encontraram superexpressão da c-erbB-2 em 82,3% dos casos.

Ulanovski et al. (2004) analisaram a expressão de EGFR e c-erbB-2 como marcadores prognósticos em 23 casos de carcinomas epidermóides de língua submetidos a glossectomia parcial e esvaziamento ganglionar com até 54 meses de acompanhamento. Em 17% dos casos analisados foi detectada a superexpressão de c-erbB-2, porém esta não demonstrou correlação com as características clínicas da neoplasia ou sobrevida dos pacientes.

Quanto ao padrão de imunoexpressão da c-erbB-2 esta pode ser observada na superfície celular, como um marcador de superfície ou pode demonstrar marcação citoplasmática. Uma associação entre os dois padrões de marcação também pode ser notada (AGUIAR et al., 2007; KHAN et al., 2002).

Silva et al. (2008) baseado em estudo imunoistoquímico e em cultura de células observaram que em epitélio oral normal, epitélio displásico e em carcinomas bem-diferenciados a expressão da c-erbB-2 tende a ser localizada na superfície da

célula, já em carcinomas pouco diferenciados a imunoexpressão da c-erbB-2 foi predominantemente citoplasmática. Conclusões semelhantes também foram reladas por Aguiar et al. (2007) e Silva et al. (2009).

A possibilidade de desenvolvimento de bloqueadores moleculares de receptores específicos da via do EGF, com consequentemente inibição do estímulo à proliferação tumoral, porém com diminuição dos danos colaterais, tem demonstrado-se como uma opção de tratamento bastante promissora, denominada terapia molecular alvo-específica (CITRI et al., 2002; GLAZER et al., 2009; HURTADO et al., 2008; SUN et al., 2008).

Como o receptor ErbB2 é pouco expresso em tecidos normais, este é um alvo muito estudado na busca de tratamentos efetivos para carcinomas que expressem esta proteína com mínimos danos às células normais (BEI et al., 2001; FONG et al., 2008).

Esta modalidade de tratamento já tem sido utilizada em casos de carcinoma de mama e a superexpressão detectada principalmente através do teste imunoistoquímico HercepTest™(DAKO). Cerca de 30% dos casos de carcinomas de mama apresentam superexpressão de c-erbB-2 e esta quando detectada sinaliza a sensibilidade ao anticorpo monoclonal anti-HER2 (rhuMAb-HER2, trastuzumab, Herceptin®). A administração deste anticorpo induz a uma rápida remoção do receptor ErbB2 da superfície da célula, reduzindo assim a sua disponibilidade para heterodímerização e consequentemente diminuindo a proliferação tumoral e muitos pacientes c-erbB-2 positivos com doença em estágio avançado alcançaram melhores índices de sobrevida (GOUVÊA et al., 2004).

A exemplo do câncer de mama, outros biomoduladores podem ser desenvolvidos a partir da identificação de biomarcadores (MANNE et al., 2005).

2.3 Vimentina

A capacidade das células em adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados depende de uma complexa rede de proteínas filamentosas que se estende por todo o citoplasma. Esta rede é chamada de citoesqueleto o qual detém um poder de reorganização contínuo, ativado sempre que a célula altera sua forma, se divide ou responde ao seu ambiente (ALBERTS et al., 1997).

A vimentina é um dos componentes do citoesqueleto, sendo o principal filamento intermediário de células de origem mesenquimal como os fibroblastos, células endoteliais, leucócitos e de células mioepiteliais de tumores benignos e malignos de glândula salivar. O clássico papel desta proteína na arquitetura celular e integridade tecidual são conhecidos, mas existem evidências que este filamento exerça um papel regulatório em outras funções celulares envolvendo a adesão, migração e sinalização celular. Especialmente interessante parece ser o papel da vimentina na transição epitélio-mesenquimal e na migração celular (IVASKA et al., 2007).

McInroy e Määttä (2007) em um estudo realizado com cultura de células de carcinoma de mama e cólon observaram que a regulação da expressão da vimentina nestes carcinomas diminui o potencial invasivo e migratório das células tumorais, o que sugere que a vimentina seja realmente fundamental para a manifestação do fenótipo invasivo em carcinomas, no entanto relataram que não existe um consenso na literatura se a vimentina é apenas um marcador de transição epitélio-mesenquimal ou se esta é necessária para a motilidade e para o comportamento invasivo das células tumorais.

Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço manifestam vários padrões biológicos, fenotípicos e de invasão, resultado de alterações das células neoplásicas e do estroma durante o desenvolvimento e progressão tumoral. Vários estudos em neoplasias epiteliais têm demonstrado que a perda de adesão e a aquisição do fenótipo mesenquimal no processo de transição epitélio-mesenquimal precede a invasão e a progressão tumoral, sendo a Caderina-E o principal componente funcionalmente inativado neste processo (GUARINO, 2007; ISLAM et al., 2000; MANDAL et al., 2008; MCINROY; MÄÄTTÄ, 2007).

Usualmente a expressão de vimentina em células epiteliais é associada à perda da Caderina-E dentre outras proteínas sinalizadoras e moléculas de adesão. Devido a esta perda de adesão, sugere-se que o aumento da expressão de vimentina esteja também relacionado ao aumento na invasão celular e presença de metástases em linhagens de carcinomas de mama, cólon, bexiga e colo de útero, entre outros. Em carcinomas de mama inclusive, a presença de vimentina tem sugerido associação com pior prognóstico (ISLAM et al., 2000).

Mandal et al. (2008) investigaram a expressão de vários fatores associados à indução da transição epitélio-mesenquimal em onze linhagens de carcinoma epidermóide e 50 espécimes de tumores primários de cabeça e pescoço. Os autores observaram correlação significante entre a diminuição da expressão da Caderina-E e o aumento da expressão de vimentina com consequente comportamento tumoral agressivo em frontes de invasão e metástases linfonodais.

Para Guarino (2007) a invasão celular em carcinomas é o primeiro dos muitos eventos em cascata que levam ao desenvolvimento de metástases, mas é atualmente o menos compreendido. Para que ocorra a invasão, inicialmente a célula epitelial precisa perder a adesão com as demais, passar por uma remodelação do

citoesqueleto e interagir com a matriz extracelular, para posteriormente adquirir capacidade de locomoção, características estas particulares das células mesenquimais e fundamentais na transição epitélio-mesenquimal.

Apesar das bases moleculares da transição epitélio-mesenquimal não serem completamente elucidadas, várias vias de sinalização ligadas à motilidade celular e um grande número de moléculas de sinalização potencialmente envolvidas foram identificadas neste processo. Incluindo fatores de crescimento, receptores tirosino-quinase e integrinas na ativação das vias da β-catenina, Src, PI3K, Ras. Todas convergindo com a regulação da Caderina-E e consequente aumento da expressão da vimentina associado à aquisição do fenótipo migratório e invasão como ilustra a Figura 2.2 (GUARINO; RUBINO; BALLABIO, 2007; O-CHAROENRAT et al., 2002; THIERY, 2002).

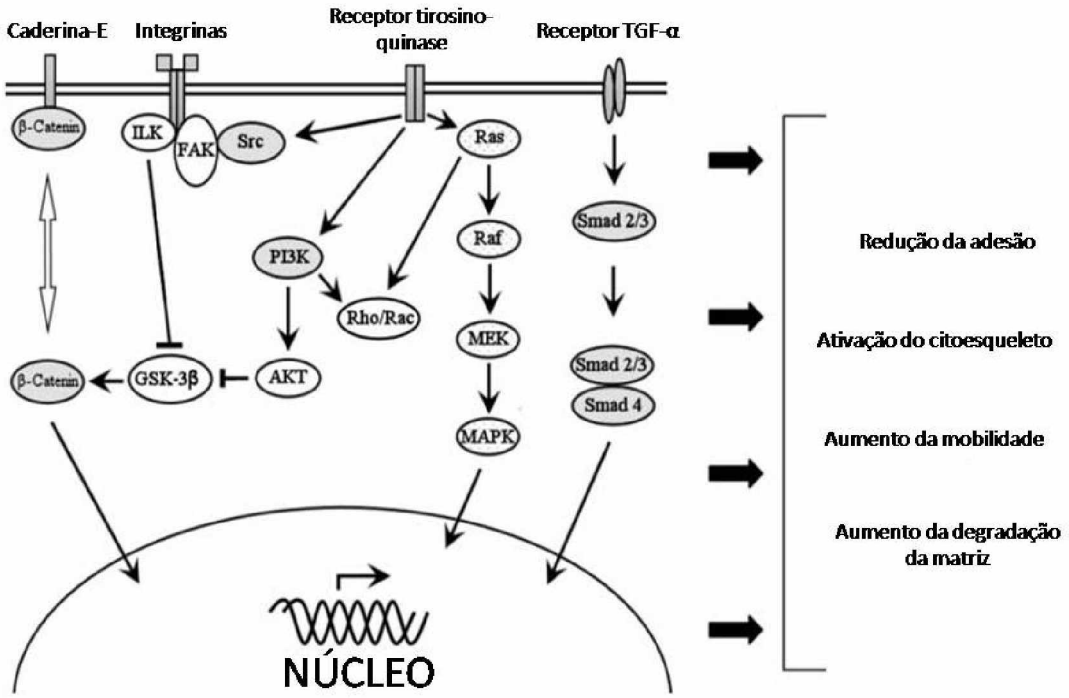

Figura 2.2 – Representação esquemática simplificada das vias de transmissão de sinal celular durante a transição epitélio mesenquimal adaptado de Guarino, Rubino e Ballabio (2007)

Hu et al. (2004) avaliaram por imunoistoquímica a associação da superexpressão da vimentina e a presença de metástases em carcinomas hepáticos a partir da avaliação de 200 casos de tumores primários. Os autores encontraram relação estatisticamente significante e sugerem que a superexpressão da vimentina pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de metástases de carcinomas hepáticos primários.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Kim et al. (2009) na avaliação da expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesenquimal em carcinomas gástricos. Utilizando-se de 598 casos associados às características clínicas e avaliando a expressão imunoistoquímica de nove proteínas epiteliais e mesenquimais, os autores concluíram que a perda de expressão de proteínas epiteliais e a aquisição de expressão de proteínas mesenquimais, incluindo a vimentina, são características relacionadas a carcinomas pobremente diferenciados, em estágios avançados e com pior prognóstico.

Soltermann et al. (2008) investigando a transição epitélio-mesenquimal como indicador prognóstico, avaliaram a imunoexpressão de algumas proteínas mesenquimais em 533 peças cirúrgicas de carcinomas primários de pulmão e detectou forte correlação entre o aumento da imunoexpressão da vimentina e lesões em estágios avançados e presença de metástases regionais (N≠1) e à distância (M1). No entanto, não observaram correlação estatisticamente significante da vimentina com o prognóstico dos pacientes.

Apesar dos indícios citados e de alguns autores terem encontrado resultados significativos na associação entre a expressão imunoistoquímica da vimentina e o prognóstico de pacientes com carcinomas, esta tem sido pouco verificada em carcinomas epidermóides de boca. Um dos poucos estudos publicados na literatura

que avaliaram a imunoexpressão da vimentina em correlação com características tumorais foi realizado por Araújo et al. (1993). Os autores avaliaram a marcação por imunoistoquímica desta proteína em 43 casos de carcinomas de boca e observaram que a vimentina estava predominantemente expressa em carcinomas mais indiferenciados e principalmente em células que adquiriram o padrão acantolítico sugerindo que a vimentina possa estar associada à invasão tumoral e metástase.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina como marcadores prognósticos do carcinoma epidermóide de boca e relacionar a imunoexpressão destas proteínas com os dados clínicos e de sobrevida dos casos estudados.

Objetivos Específicos

1. Analisar o padrão de expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina quando presentes;
2. Verificar a relação entre os dados clínicos coletados e a expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina;
3. Analisar a correlação da expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina entre si;
4. Avaliar a relação da expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina com a sobrevida dos pacientes;
5. Verificar a relação das variáveis clínicas analisadas com a sobrevida dos pacientes;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo e seleção das amostras

O estudo foi realizado a partir da análise retrospectiva dos casos de CEB do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás e do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Ofir Loyola de Belém (Pará - PA), no período de 01 de janeiro de 1997 a 31 de dezembro de 2003. Para a definição topográfica de CEB foi utilizado o conceito da UICC que delimita os sítios anatômicos que compõem a boca em: língua (2/3 anteriores e bordas laterais), assoalho de boca, rebordo alveolar (inferior, superior e gengiva), palato duro e mucosa bucal (mucosa jugal e trígono retromolar) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 1997).

Para a seleção da amostra deste estudo foram utilizados alguns critérios de inclusão e exclusão dos casos.

4.1.1 Critérios de inclusão:

- Tumores primários não tratados, cujas amostras teciduais fixadas em formaldeído a 10% e emblocadas em parafina exibiam diagnóstico de CEB confirmado em coloração de rotina HE (hematoxilina-eosina).
- Com disponibilidade de fragmentos representativos da neoplasia em adequado

estado de conservação.

- Posteriormente submetidos a tratamento no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge/ACCG (Associação de Combate ao Câncer em Goiás) ou no Hospital Ofir Loyola – Belém (PA).
- Com seguimento clínico completo, por um período mínimo de 48 meses e máximo de 60 meses, descritos nos prontuários disponíveis no SAME (Serviço de Arquivo Médico) dos respectivos hospitais.

4.1.2 Critérios de exclusão:

- Presença de metástase à distância M(+) no momento do diagnóstico.
- Presença de tumores primários simultâneos.
- Posteriormente não tratados ou tratados por outro serviço que não os especificados nos critérios de inclusão.
- Casos no qual houve alteração do estadiamento clínico TNM entre o diagnóstico inicial e a execução do tratamento.

Depois de estabelecidos estes critérios, um total de 78 casos foi selecionado para estudo e os dados clínicos e de acompanhamento dos pacientes foram coletados dos prontuários.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO-USP, sob o protocolo n° 190/07 em 04 de dezembro de 2006 (Anexo A).

4.2 Dados clínicos coletados

Os dados clínicos coletados e utilizados neste estudo (Apêndice A) foram os seguintes:

I - Características pessoais do paciente:

- Identificação através do número do prontuário
- Gênero
- Idade
- Hábito de fumar cigarro
- Consumo crônico de bebida alcoólica

II - Aspectos gerais da neoplasia:

- Localização primária do tumor
- Estadiamento clínico TNM
- Estádio da doença (AJCC)

III – Dados do Tratamento:

- Cirúrgico (combinado ou não com radioterapia adjuvante)
- Não cirúrgico (tratamento quimioterápico ou radioterápico combinado ou não)

IV - Dados do Acompanhamento:

- Ocorrência de recidiva local
  - Tempo livre de doença (determinado entre a data do início do tratamento e a detecção de recidiva local)
- Desfecho clínico
  - Sobrevida em meses (determinado entre a data do início do tratamento e a data do óbito em conseqüência da neoplasia ou data da última informação de seguimento)

4.3 Técnica de imunoistoquímica

As 78 amostras selecionadas de carcinoma epidermóide de boca emblocadas em parafina foram então seccionadas em cortes histológicos de 3 µm em micrótomo mecânico e estendidas em lâminas de vidro, previamente silanizadas. Para este processo as lâminas foram lavadas em etanol absoluto, secas e imersas por cinco minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano a 10% (Sigma Chemical, St. Louis, USA) diluída em etanol absoluto, e permaneceram em estufa a 37º C durante 24 horas para secagem final antes do uso.

Os cortes histológicos provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Goiás e do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Ofir Loyola foram inicialmente armazenados em estufa a 60°C por no mínimo 24 horas para melhor fixação do corte antes de submetidos à técnica de imunoistoquímica, utilizando-se o método da imunoperoxidase (estreptavidina-biotina-peroxidase). Todos os procedimentos da técnica assim como a padronização do uso de cada um dos anticorpos foram desenvolvidos no Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os cortes foram desparafinizados em duas imersões em xilol, sendo a primeira em estufa a 60 ^{o}C por 30 minutos e a segunda por 20 minutos em temperatura ambiente e reidratados através de três imersões consecutivas em álcool absoluto seguidas de imersões em concentrações decrescentes de etanol, 95% e 85%, por cinco minutos cada. Para remoção do pigmento formólico estes foram imersos por dez minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a

95% e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos em água destilada a seguir por 5 minutos.

Para a recuperação antigênica as lâminas que receberam os anticorpos anti-vimentina foram imersas em solução de ácido cítrico monoidratado (10nM – pH 6,0) enquanto as que receberam os anticorpos anti-c-erbB-2 foram imersas em solução de EDTA (pH 8,0). Todas foram mantidas aquecidas em banho maria a 95 ^{o}C por 30 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, seguida por duas trocas subseqüentes de água destilada com intervalo de 5 minutos.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes (6%) e metanol (1:1) e lavados novamente em água corrente por 10 minutos e dois banhos em água destilada por 5 minutos cada. Por fim, para tamponamento os cortes foram mantidos imersos por 5 minutos em solução de TRIS (pH 7,4) seguido da troca da solução por mais duas vezes com igual intervalo de tempo.

Os anticorpos utilizados neste estudo foram anti-vimentina (Monoclonal, clone V9, camundongo, Dako Corporation, Glostrup, Denmark) preparado sob diluição 1:800 µg/ml e anti-c-*erb*B-2/Neu (monoclonal, clone C-18, camundongo, Santa Cruz, Biotechnology, InC) preparado sob diluição 1:100 µg/ml.

Todos os passos a seguintes, desde a utilização dos anticorpos primários até a contra coloração foram realizados de forma automatizada com o auxílio do sistema de coloração universal Dako Cytomation Autostainer (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark) com preparação prévia dos volumes necessários. As lâminas foram acomodadas no equipamento e como soro secundário e complexo terciário foi utilizado o Kit LSAB peroxidase K0690 (DAKO, Glostrup, Denmark). Para a

revelação da reação utilizou-se a solução cromógena DAB (3,3' diaminobenzidina, K3468; DAKO, Glostrup, Denmark) e para a realização da contra-coloração foi usada hematoxilina de Mayer.

Finalizado o processamento automatizado, as lâminas foram retiradas do processamento e os cortes desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%), e diafanizados em 2 banhos de xilol e montados com resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA).

Para as reações com o anticorpo anti-c-erbB-2 foram utilizadas como controle positivo amostras de carcinomas de mama com expressão imunoistoquímica forte e abundante para esta proteína. Para a vimentina o controle positivo foi a marcação abundante nas células de origem mesenquimal nos próprios cortes. Os controles negativos usados foram as mesmas amostras utilizadas como controle positivo, porém submetidas à reação imunoistoquimica sem a incubação do anticorpo primário.

4.4 Avaliação da expressão imunoistoquímica

As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Zeiss-Axiolab) e foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada após a reação imunoistoquímica, o que caracteriza a presença do cromógeno DAB e consideradas negativas as células que não exibiam esta coloração.

Todos os casos onde a imunomarcação foi duvidosa ou não houve marcação

dos controles a reação foi repetida.

A expressão imunoistoquímica foi analisada de forma semi-quantitativa baseada na intensidade de marcação e na proporção de células tumorais marcadas na amostra tecidual. Esta foi interpretada por dois observadores independentes sem o conhecimento de qualquer parâmetro clínicopatológico, e sem correlação entre os marcadores avaliados.

O método semi-quantitativo de avaliação têm sido utilizado em inúmeras pesquisas de marcadores prognósticos imunoistoquímicos (MUNOZ-GUERRA et al., 2005; SILVA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; ROSS et al., 2004; ETTL et al., 2008). A intensidade de marcação foi classificada como: 0, negativa (nenhuma reatividade ou reatividade em <10% das células tumorais); 1+, reatividade fraca em $\geq$ 10% das células tumorais; 2+, reatividade moderada em $\geq$ 10% das células tumorais; 3+, reatividade forte em $\geq$ 10% das células tumorais. A imunoexpressão para c-erbB-2 foi considerada positiva quando classificada como 2+ ou 3+, de modo análogo ao câncer de mama. Para a vimentina, foram consideradas positivas as amostras classificadas como 1+, 2+ ou 3+. Exemplos de modelo de reatividade podem ser vistos nas Figuras 5.1 (c-erbB-2) e Figura 5.2 (vimentina).

4.5 Análise estatística dos resultados

A análise de frequência das variáveis clínicas em tabelas de contingência e sua relação com os marcadores imunoistoquímicos dicotomizados foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico do qui-quadrado ou exato de Fisher quando aplicável.

Para a análise de correlação entre a expressão imunoistoquímica do c-erbB-2 e da vimentina foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Na avaliação de sobrevida global durante todo o período de seguimento dos casos foi considerada a data de submissão ao tratamento como ponto inicial e a data do óbito em consequência da doença, ou último seguimento, como ponto final. O óbito foi considerado como evento e a perda do seguimento como censura. O tempo livre de doença não pode ser verificado em virtude da inclusão de casos no estudo não tratados cirurgicamente, e pela ausência desde dado em alguns casos operados. A sobrevida em intervalos de 12 meses foi demonstrada utilizando-se o quadro vital ou método atuarial.

Para a análise univariada de sobrevida, as curvas de sobrevida global foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as distribuições foram comparadas utilizando-se o teste log rank. As variáveis consideradas significantes foram selecionadas para o modelo de análise multivariada assim a imunoexpressão das proteínas avaliadas.

O modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para a análise multivariada e verificação do efeito independente das variáveis na sobrevida dos pacientes.

O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%, ou seja, quando o valor de p do teste estatístico é menor ou igual a 0,05 existe significância estatística.

Para viabilizar alguns cálculos estatísticos algumas categorias foram agrupadas como:

- Idade: agrupados em ($\leq$ 60 anos) e (> 60 anos), após determinadas as idades mínima e máxima e definida a idade média dos pacientes.
- Local: agrupados em Língua, Assoalho e outros (rebordo alveolar, palato e

mucosa bucal)

- Estadiamento T: agrupados em (T1 + T2) e (T3 + T4)
- Estadiamento N: agrupados em N negativo(N0) e N positivo (N1, N2a, N2b, N2c, N3)
- Estádio da doença (AJCC): agrupados em (I + II) e (III e IV A, B e C)
- Tratamento: agrupados em cirúrgico (cirúrgico acompanhado ou não de tratamento adjuvante, associado a esvaziamento cervical ou não) e não-cirúrgico (radioterapia e quimioterapia, associados ou não)

A execução dos cálculos estatísticos foi realizada utilizando-se o software SPSS for Windows, versão 13.0 (SPSS, Erkrath, Alemanha) e a escolha dos testes baseado em Armitage e Berry (1994).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Dos 78 casos incluídos no estudo, 13 tiveram que ser excluídos em virtude dos seguintes fatores:

- Desprendimento do corte após a reação imunoistoquímica

- Não reatividade do tecido observada em comparação com os controles mesmo após a repetição da reação

Os resultados basearam-se então no estudo de 65 casos de Carcinoma Epidermóide de Boca cujas características clínicas estão sumariadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características clínicas dos pacientes avaliados no estudo.

Variável	Categoria	Casos N(%)
Sexo	Masculino	44(67,7)
	Feminino	21(32,3)
Idade	≤ 60 Anos	27(41,5)
	> 60 Anos	38(58,5)
Tabagismo*	Fumantes	48(82,8)
	Não Fumantes	10(17,2)
Etilismo*	Bebem	34(59,6)
	Não Bebem	23(40,4)
Local	Língua	44,6 (29)
	Assoalho	27,7 (18)
	Outros	24.6 (16)
T	T1 + T2	10(15,4)
	T3 + T4	55(84,6)
N	Negativo	24(36,9)
	Positivo	41(63,1)
Estadiamento	I + II	7(10,8)
	III + IV	58(89,2)
Tratamento	Cirúrgico	64,6 (42)
	Não Cirúrgico	35,4 (23)
Pós-Tratamento	Óbito	46(70,8)
	Acompanhamento	19(29,2)

*Frequências analisadas apenas nos casos que tinham esta informação disponível.

Dentre os pacientes que participaram do estudo, 44 (67,7%) eram homens e 21(32,3) eram mulheres com média de idade de 61,37 anos, variando entre 25 e 93 anos. Apenas 58 dos pacientes forneceram dados em relação ao tabagismo, de forma que 82,8% destes se declararam fumantes. Do total de pacientes analisados, apenas 57 informaram o hábito de ingerir ou não bebidas alcoólicas com freqüência, sendo que a maioria apresentava este hábito (59,6%). O sítio primário acometido com maior frequência foi a língua (44,6%) seguido pelo assoalho de boca (27,7%). Em relação ao estadiamento clínico das neoplasias no momento do diagnóstico, este foi considerado eminentemente avançado (T3 + T4 - 84,6%; N positivo: 63,1%; Estádios III e IV: 89,3%). A maior parte dos pacientes foi tratada com intervenção cirúrgica (64,6%). Do total de pacientes analisado, 70,8% (N=46) vieram a óbito, sendo considerados assim, para fins de análise, como falhas.

5.2 Expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina

Quanto à expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas, esta foi positiva para o c-erbB-2 em 40 dos 65 casos avaliados e 36 casos apresentaram marcação positiva para a vimentina. O critério de determinação de positividade e negatividade das amostras demonstrou-se simples e reprodutível.

O padrão de imunoexpressão observado para ambas as proteínas analisadas foi eminentemente citoplasmático, com células tumorais demonstrando moderada ou intensa expressão imunoistoquímica como demonstrado nas Figuras 5.1 e 5.2.

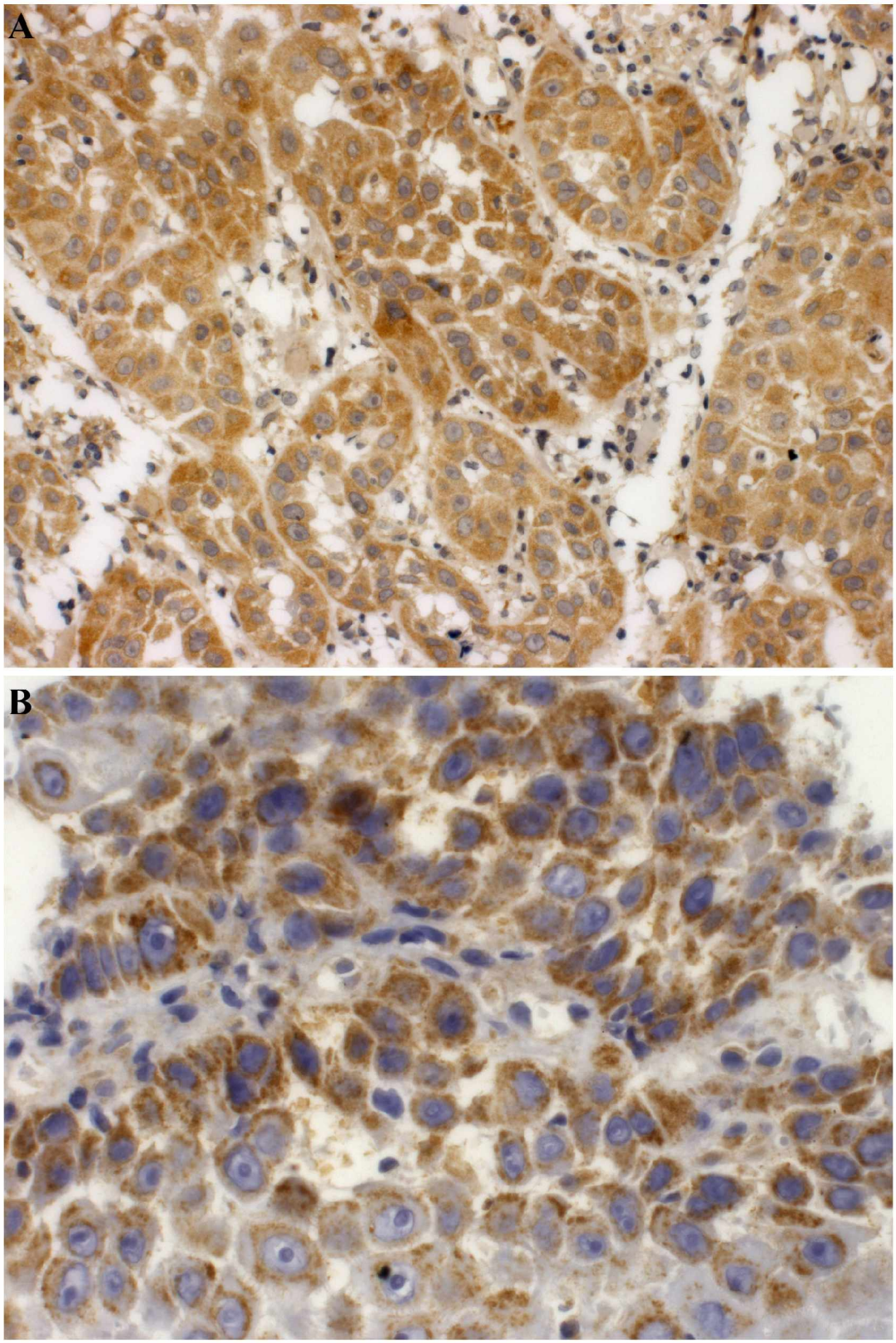

Figura 5.1 - Imunoexpressão da proteína c-erbB-2 (estreptavidina-biotina); A: 200x, B: 400x

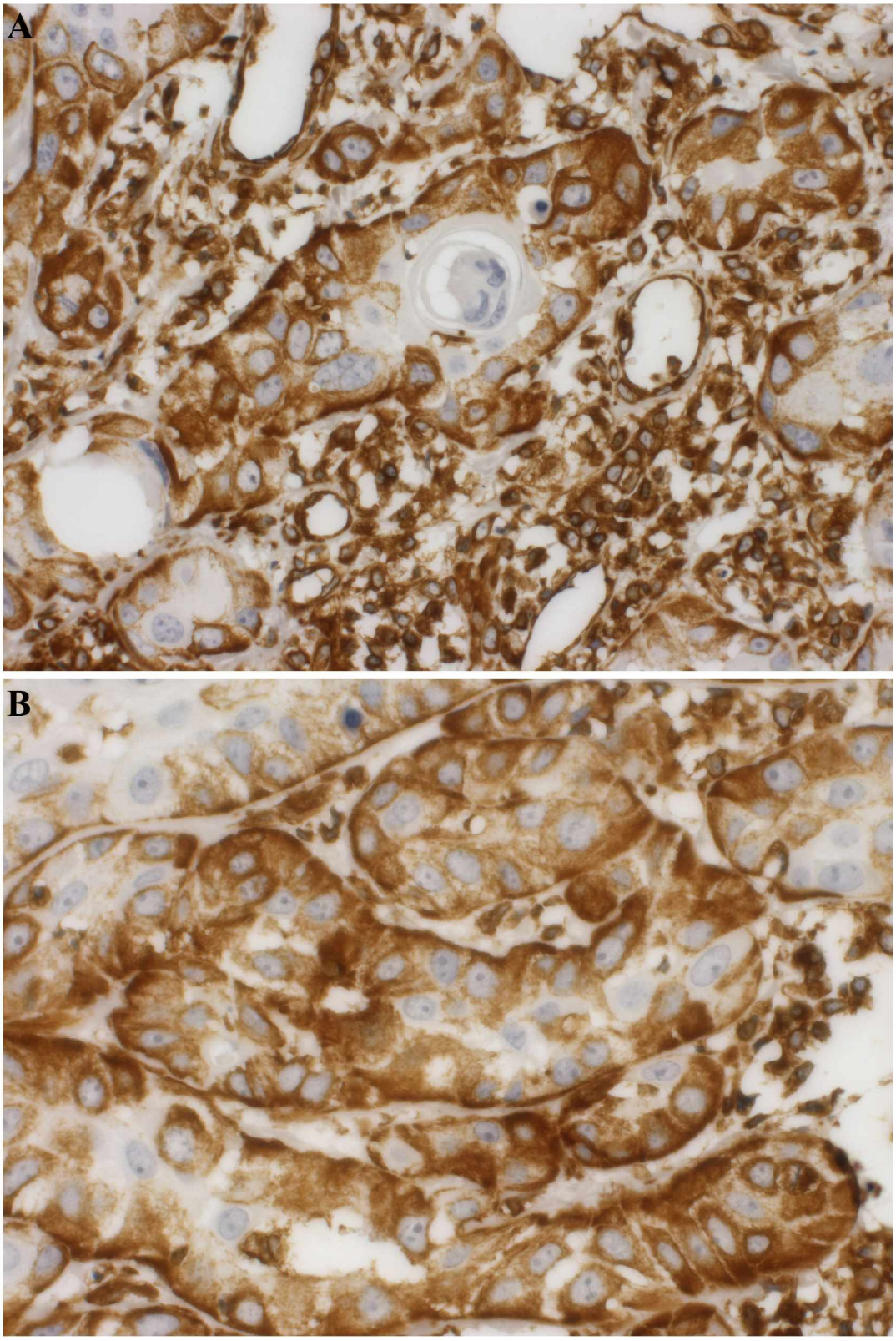

Figura 5.2 - Imunoexpressão da proteína vimentina (estreptavidina-biotina); A: 200x, B:400x

5.2.1 Correlação com características clínicas

A Tabela 5.2 mostra a relação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas Vimentina e c-erbB-2 com as variáveis clínicas nos casos estudados.

Tabela 5.2 – Correlação entre a expressão imunoistoquímica da Vimentina e c-erbB-2 com os dados clínicos dos pacientes avaliados no estudo

Variável	**Categoria**	**Casos N(%)**	**Vimentina**			**c-erbB-2**		
			+	**-**	**p**	**+**	**-**	**p**
Sexo	Masculino	44(67,7)	21	23	0,072	27	17	0,967
	Feminino	21(32,3)	15	6		13	8	
Idade	≤ 60 Anos	27(41,5)	15	12	0,981	16	11	0,750
	> 60 Anos	38(58,5)	21	17		24	14	
Tabagismo	Fumantes	48(82,8)	30	18	0,336	30	18	0,930
	Não Fumantes	10(17,2)	4	6		7	3	
Etilismo	Bebem	34(59,6)	22	12	0,344	22	12	0,768
	Não Bebem	23(40,4)	12	11		14	9	
Local	Língua	44,6 (29)	18	11	0,497	19	10	0,194
	Assoalho	27,7 (18)	8	10		13	5	
	Outros	24.6 (16)	10	8		8	10	
T	T1 + T2	10(15,4)	7	3	0,506	8	2	0,341
	T3 + T4	55(84,6)	29	26		32	23	
N	Negativo	24(36,9)	17	7	0,055	15	9	0,903
	Positivo	41(63,1)	19	22		25	16	
Estadiamento	I + II	7(10,8)	5	2	0,616	5	2	0,874
	III + IV	58(89,2)	31	27		35	23	
Tratamento	Cirúrgico	64,6 (42)	23	19	0,891	26	16	0,935
	Não Cirúrgico	35,4 (23)	13	10		14	9	
Pós-Tratamento	Óbito	46(70,8)	27	19	0,437	29	17	0,63
	Acompanhamento	19(29,2)	9	10		11	8	

Significância estabelecida em α=5% ($p<0,05$)

Para esta análise foi utilizado o teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando aplicável. Como observado na Tabela 5.2, não foi encontrada nenhuma relação entre os marcadores Vimentina e c-erbB-2 com os dados clínicos dos pacientes analisados no estudo, no nível de significância estabelecido.

5.2.2 Correlação entre si

Para avaliar a relação entre as variáveis de imunoexpressão da vimentina e da c-erbB-2 foi utilizado o teste do qui-quadrado. Casos com expressão imunoistoquimica positiva para vimentina tenderam a ter imunoexpressão positiva também para a c-erbB-2, porém este dado não foi estatisticamente significante como observado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Teste qui-quadrado para avaliação da correlação entre as categorias das variáveis de imunoexpressão de Vimentina e c-erbB-2

	c-erbB-2			
Vimentina	**negativo**	**positivo**	**TOTAL**	**p**
negativo	13	16	29	0,344
positivo	12	24	36	
TOTAL	25	40	65	

Significância estabelecida em α=5% (p<0,05)

Para se verificar uma possível correlação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas Vimentina e c-erbB-2, foi utilizado o teste de correlação de Spearman, e os resultados são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Análise de correlação entre a imunoexpressão da Vimentina e da c-erbB-2 utilizando-se o Teste de Spearman

Variáveis Correlacionadas	Coeficiente de Correlação	Valor de p
Vimentina x c-erbB-2	0,117	0,351

Significância estabelecida com α=5% (p<0,05)

Como observado na Tabela 5.4, não foi encontrada correlação estatisticamente significante entre as duas proteínas.

5.3 Análise de sobrevida global

A sobrevida média dos pacientes de 11,91 meses, variando de 1 a 72 meses com proporções de sobrevida em 3 anos e 5 anos de 33,8% e 29,23%, respectivamente. Ao final do período de acompanhamento pós-tratamento 46 pacientes morreram em consequência da neoplasia e 19 pacientes não tiveram o óbito registrado e foram considerados como dados de censura. A Tabela 5.5 a seguir mostra os dados de sobrevida dos pacientes em intervalos de 12 meses, pelo método atuarial ou do quadro vital.

Tabela 5.5 – Análise do quadro vital dos 65 pacientes avaliados no estudo

i	n_i	w_i	er_i	d_i	p_i	S_i
0-12 meses	65	3	63,5	32	0,50	0,50
13-24 meses	30	3	28,5	8	0,72	0,36
25-36 meses	19	1	18,5	3	0,89	0,32
37-48 meses	15	3	14,5	3	0,79	0,25
49-60 meses	9	5	7,5	0	1,00	0,25

i: intervalo em meses; n_i: número incluído no intervalo; w_i: número excluído durante o intervalo; er_i: número exposto ao risco; d_i: número de eventos terminais; p_i: proporção de sobreviventes; S_i: proporção cumulativa dos que sobreviveram até o final

Para análise de sobrevida global dos pacientes avaliados no estudo, foi utilizado o método do produto limite de Kaplan-Meier. A princípio foi desenhado o gráfico de sobrevida global, conforme o Gráfico 5.1.

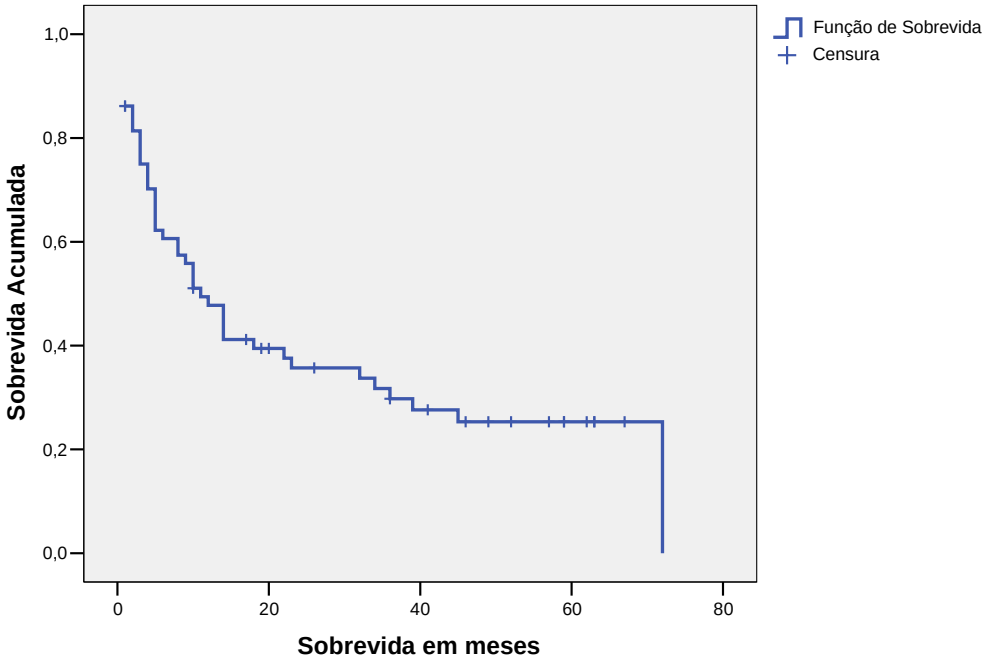

Gráfico 5.1 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os 65 indivíduos avaliados neste estudo

5.3.1 Correlação com características clínicas e expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina

As curvas de sobrevida foram desenhadas considerando-se cada um dos fatores clínicos em estudo e comparadas pelo teste do *log-rank* e os resultados deste teste podem ser vistos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Teste do *log-rank* para as curvas de sobrevida representativas de cada um dos fatores avaliados no estudo

Variável	Categoria	Casos N(%)	p
Sexo	Masculino	44(67,7)	0,004*
	Feminino	21(32,3)	
Idade	≤ 60 Anos	27(41,5)	0,977
	> 60 Anos	38(58,5)	
Tabagismo	Fumantes	48(82,8)	0,026*
	Não Fumantes	10(17,2)	
Etilismo	Bebem	34(59,6)	0,330
	Não Bebem	23(40,4)	
Local	Língua	44,6 (29)	0,984
	Assoalho	27,7 (18)	
	Outros	24.6 (16)	
T	T1 + T2	10(15,4)	0,183
	T3 + T4	55(84,6)	
N	Negativo	24(36,9)	0,002*
	Positivo	41(63,1)	
Estadiamento	I + II	7(10,8)	0,049*
	III + IV	58(89,2)	
Tratamento	Cirúrgico	64,6 (42)	0,002*
	Não Cirúrgico	35,4 (23)	
c-erbB-2	Positivo	40 (61,54)	0,731
	Negativo	25 (38,46)	
Vimentina	Positivo	46(70,8)	0,986
	Negativo	19(29,2)	

* Valor considerado estatisticamente significante usando α=5%(p<0,05)

Com base nestes resultados, as curvas de sobrevida representativas destes dados são mostradas nos Gráficos 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6.

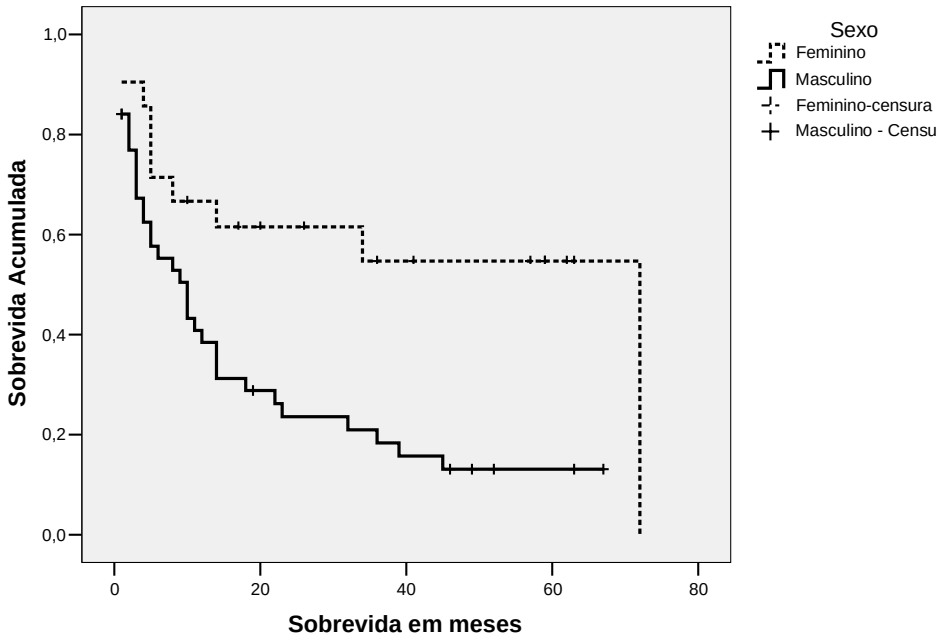

Gráfico 5.2 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos do sexo masculino e feminino obtidos da amostra de 65 pacientes estudados

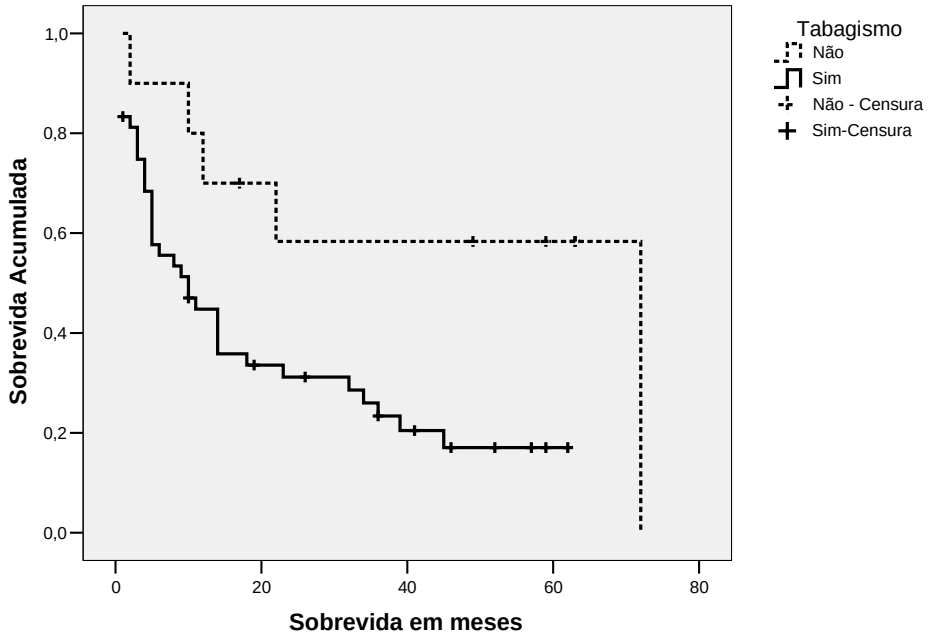

Gráfico 5.3 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tabagistas e não tabagistas obtidos da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

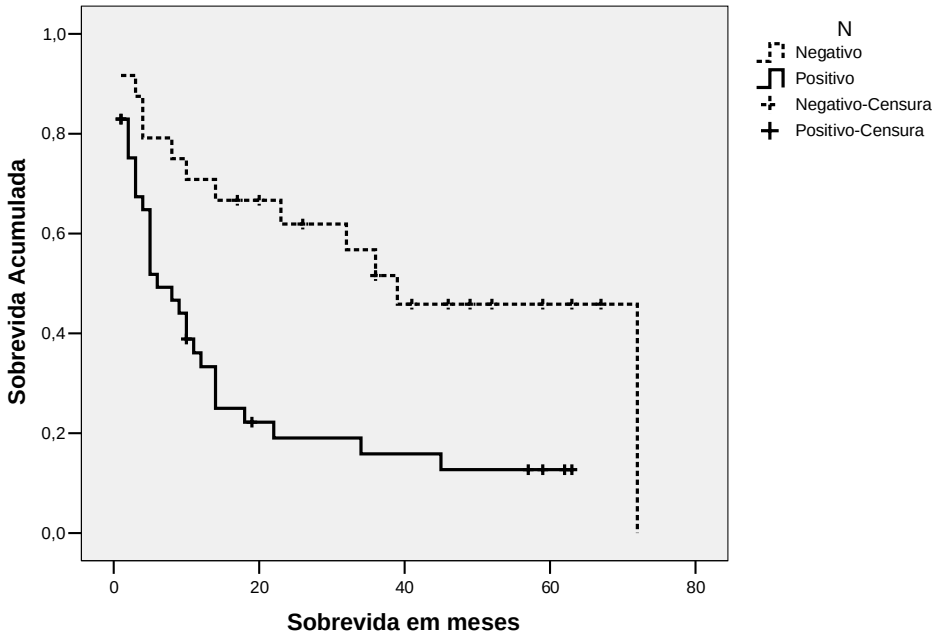

Gráfico 5.4 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os indivíduos com tumores diagnosticados com estádio N negativo e N positivo, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

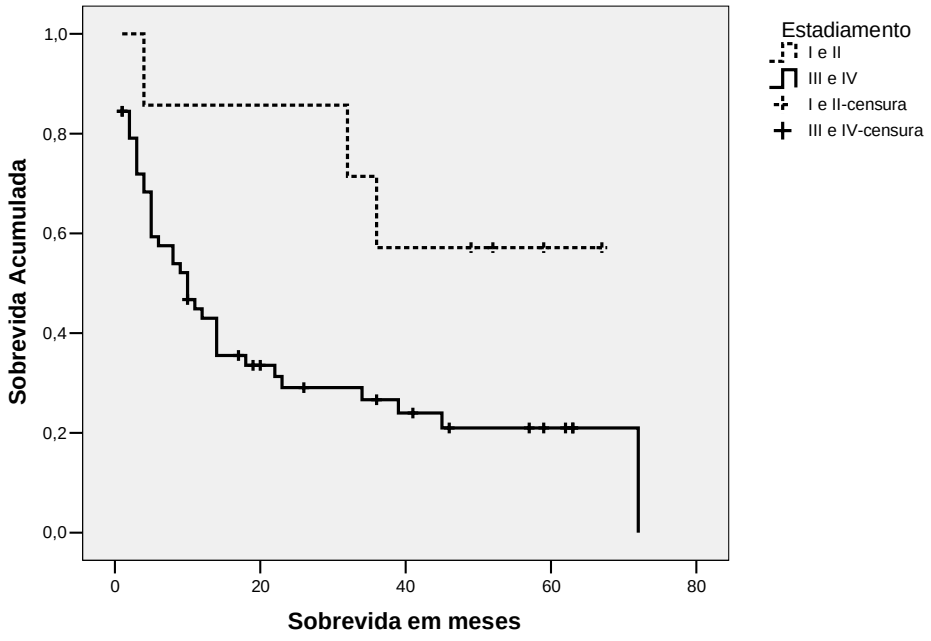

Gráfico 5.5 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os indivíduos com tumores com estadiamento clínico I + II e III + IV, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

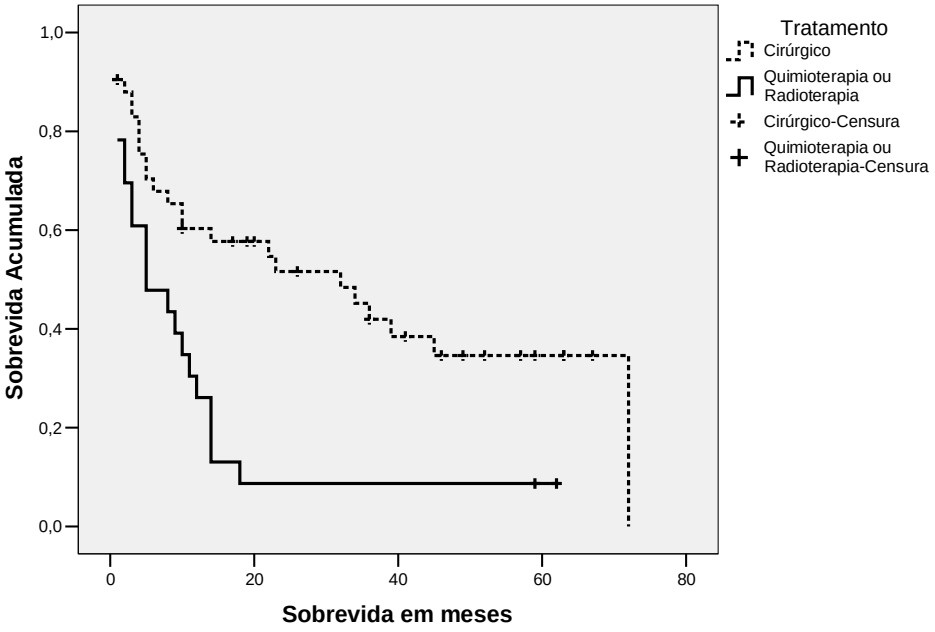

Gráfico 5.6 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tratados cirurgicamente e não cirurgicamente, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

Mesmo não havendo significância estatística que demonstrasse diferença entre as curvas de sobrevida relativa aos marcadores Vimentina e c-erbB-2, as mesmas foram obtidas e são mostradas nos Gráficos 5.7 e 5.8.

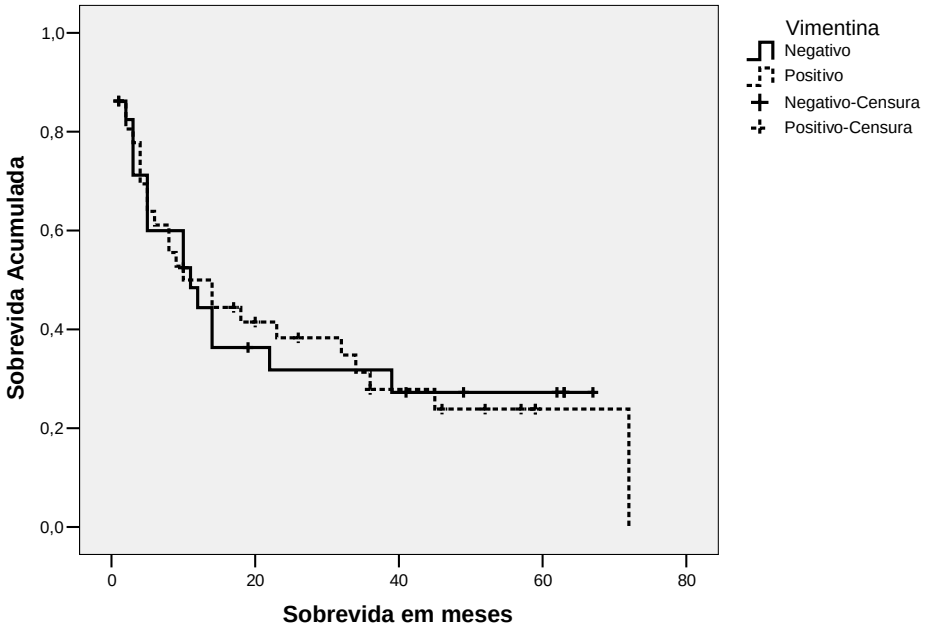

Gráfico 5.7 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para amostras com expressão positiva ou negativa da proteína Vimentina, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

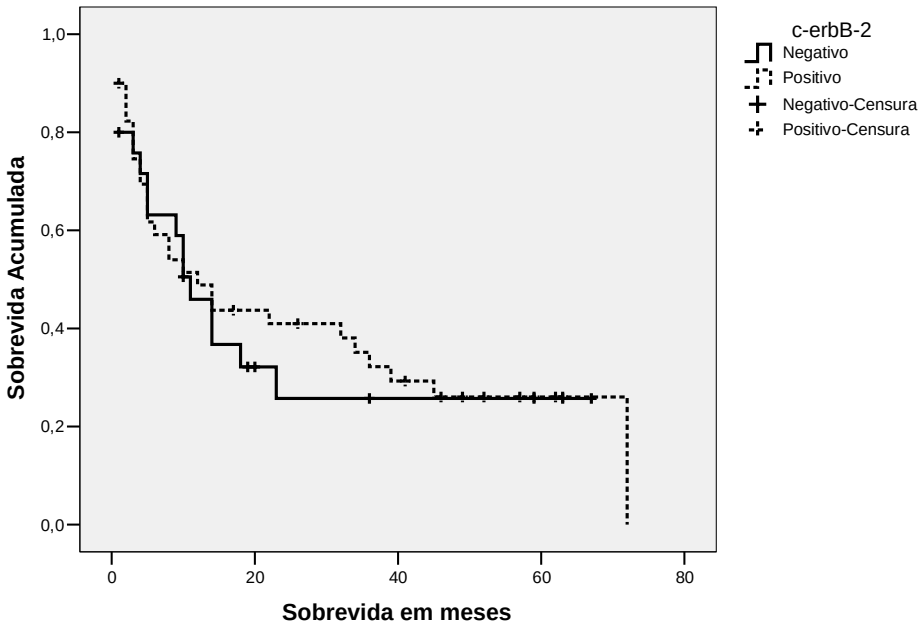

Gráfico 5.8 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para amostras com expressão positiva ou negativa da proteína c-erbB-2, obtidas da amostra de 65 pacientes avaliados no estudo

A análise univariada dos 65 casos estudados revelaram um grande número de fatores que indicaram pior prognóstico. Em relação à variável sexo, observa-se que os indivíduos do sexo masculino apresentam sobrevida menor que aqueles do sexo feminino (P=0,004), como observado no Gráfico 5.2. Da mesma forma, o Gráfico 5.3 mostra que indivíduos tabagistas têm menor sobrevida do que aqueles que não fumam (P=0,026). Pacientes diagnosticados como sendo N positivo, como visto no Gráfico 5.4, apresentam menor sobrevida do que aqueles diagnosticados como sendo N negativo (P=0,002). Pacientes com tumores em estadiamentos I e II tem maior sobrevida do que aqueles que apresentam tumores em estágios mais avançados da doença (P=0,049), como pode ser visto no Gráfico 5.5. Já o Gráfico 5.6 mostra que pacientes tratados cirurgicamente tem maior sobrevida do que aqueles não submetidos ao tratamento cirúrgico (P=0,002). Os Gráficos 5.7 e 5.8 confirmam visualmente os achados do teste estatístico do *log-rank*, mostrando que os pacientes cujas amostras analisadas expressavam ou não as proteínas vimentina

e c-erbB-2 apresentaram sobrevida semelhante, como pode ser visto pela semelhança das curvas de sobrevida para cada proteína. Para melhor avaliação da influência do tipo de tratamento executado com as demais variáveis clínicas incluindo a imunoexpressão das proteínas avaliadas o grupo cirúrgico e não-cirúrgico foram avaliados separadamente, porém também não houve correlação significante da expressão imunoistoquímica da vimentina e do c-erbB-2 com a sobrevida dos pacientes nos dois grupos avaliados em separado.

5.3.2 Análise de fatores prognósticos independentes

As variáveis consideradas significantes para a sobrevida dos pacientes pelo teste do *log-rank*, bem como os marcadores Vimentina e c-erbB-2, foram avaliadas pelo modelo dos riscos proporcionais de Cox, para se verificar o efeito isolado de cada uma delas na sobrevida dos pacientes, e os resultados podem ser vistos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Modelo dos riscos proporcionais de Cox para avaliação do efeito de cada uma das variáveis consideradas significantes pela análise univariada

Variável	**P**	**Taxa de Tendência**	**Intervalo de Confiança de 95%**	
			Inferior	**Superior**
Sexo	0,007*	2,905	1,345	6,274
Tabagismo	0,246	0,516	0,169	1,577
N	0,319	0,657	0,288	1,501
Estadiamento	0,211	0,637	0,314	1,291
Tratamento	0,606	0,835	0,422	1,654
Vimentina	0,446	1,295	0,666	2,516
c-erbB-2	0,361	0,533	0,138	2,056

* Considerado estatisticamente significante com α=5% (p<0,05)

Apenas a variável sexo influenciou significativamente a sobrevida dos pacientes estudados (p=0,007) como fator independente. Pacientes do sexo masculino apresentaram risco ou tendência 2,905 vezes maior de morrerem que os do sexo feminino, sendo este valor estatisticamente significante, como observado na Tabela 5.7.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é uma neoplasia epitelial comum no qual grande parte destes tumores é derivada da mucosa da cavidade oral cujo índice de sobrevida permanece estagnado há várias décadas.

O curso clínico de pacientes com CEB é determinado por fatores específicos do tumor primário, características do hospedeiro e naturalmente pelo tipo de tratamento aplicado. Devido a esta gama de fatores, torna-se muito difícil prevê-lo e ainda hoje permanece sem resposta o porquê alguns pacientes evoluem melhor que outros com doença diagnosticada no mesmo estágio clínico, mesmo sítio anatômico e submetidos à mesma modalidade de tratamento.

Atualmente as decisões a cerca da modalidade terapêutica aplicada a pacientes com CEB são baseadas em parâmetros clinico-patológicos, incluindo principalmente o estadiamento clínico TNM e a graduação histológica. Apesar de úteis, estes fatores frequentemente falham na diferenciação entre lesões mais ou menos agressivas.

Na busca por indicadores prognósticos mais confiáveis inúmeros genes e alterações moleculares associados à oncogênese oral têm sido avaliados vislumbrado um melhor entendimento deste processo para que métodos mais precisos de diagnóstico identifiquem pacientes com doenças agressivas, com alto risco de metástase e recidiva de modo confiável e reprodutível, para que estes sejam submetidos a um tratamento primário mais agressivo e a uma provável sobrevida livre de doença.

Considerando que as metástases para linfonodos são sabidamente o mais importante fator prognóstico reconhecido e que para a ocorrência da invasão e metástase múltiplos eventos celulares são necessários, incluindo alterações no citoesqueleto, perda dos contatos de adesão célula-célula e alteração da matriz protéica, em nosso trabalho, optamos por analisar dois tipos distintos de proteínas: Um receptor tirosino-quinase de membrana (c-erbB-2), intimamente associado à proliferação celular na carcinogênese e um filamento intermediário do citoesqueleto (vimentina) presente em células com capacidade migratória reconhecida. Esta escolha teve por objetivo verificar se existe correlação entre o estímulo à proliferação e a aquisição do fenótipo mesenquimal da célula neoplásica.

Para O-charoenrat et al. (2002) a super-expressão da c-erbB-2, observada em microvilosidades e saliências da membrana plasmática em células de carcinomas de mama estimuladas por fatores quimiotáticos, induz o aumento da capacidade invasiva e metastática da célula por estimulação da expressão da matriz de metaloproteinases.

A exemplo do carcinoma de mama, múltiplos estudos tem avaliado a detecção de c-erbB-2 e sua implicação no prognóstico dos pacientes com CEB (CHEN et al., 2004; PARISE JÚNIOR et al., 2004; SILVA et al., 2004, 2008, 2009; WU et al., 2008).

Poucos são os trabalhos que analisam a expressão de c-erbB-2 isoladamente. A grande maioria dos estudos avalia a expressão de c-erbB-2 em associação com outras proteínas supostamente interligadas, como a correlação entre a expressão de diferentes receptores ErbB, principalmente ErbB e ErbB2, ou a correlação entre a expressão de ErbB2 e FAS ou sua expressão associada com Ki-67, P53, Bcl-2, dentre outros (SATO et al., 2007; SERRANO et al., 2006) Nenhum

estudo até então havia avaliado a expressão de c-erbB-2 em correlação com a vimentina.

Apesar de numerosos, os resultados observados da imunoexpressão de c-erbB-2 em relação aos parâmetros clínicos e sobrevida demonstram-se conflitantes. Poucos são os estudos relatados que detectaram correlação significante da expressão imunoistoquimica c-erbB-2 com parâmetros clínicos ou patológicos ou de sobrevida (ALBUQUERQUE et al., 2003; IBRAHIM et al., 1997; KHADEMI; SHIRAZI; VASEI, 2002; XIU; LAU; ZHANG, 1997,1999).

Khan et al. (2002) propuseram-se a caracterizar a imunoexpressão da c-erbB-2 em carcinomas de cavidade oral e orofaringe a partir da análise de 56 casos de doença avançada, tratados cirurgicamente e com seguimento clínico por 5 anos. c-erbB-2 foi detectada em 17% dos casos, não sendo observada correlação com características clínicas ou sobrevida.

Silva et al. (2004) também não verificaram associação da c-erbB-2 com a sobrevida dos pacientes com CEB porém relataram que existe correlação entre a expressão de c-erbB-2 em membrana e a expressão de FAS e sugerem que quando ambas apresentam expressão positiva esta por ser preditiva de melhor prognóstico.

Dos 65 casos analisados em nosso estudo observamos um alto índice de imunoexpressão positiva para c-erbB-2, com 61,5% dos casos considerados positivos. Porém não observamos correlação estatisticamente significante entre a imunoexpressão da c-erbB-2 e as variáveis clínicas estudadas. Assim como não observamos correlação com a sobrevida dos pacientes avaliados. Resultados semelhantes foram relatados por Aguiar et al. (2007) dentre outros autores.

Em nosso estudo, todos os casos considerados positivos tiveram marcação eminentemente citoplasmática ou em associação com a membrana. Em nenhum dos casos analisados foi detectada marcação exclusivamente em membrana.

Para Angiero et al. (2008) e Khan et al. (2002) muitos trabalhos consideram a marcação citoplasmática como positiva apesar de sabido que a localização deste receptor é na membrana citoplasmática. Para os autores este padrão de imunomarcação não deve ser considerada positiva sendo este um importante fator que contribui para a discrepância dos resultados encontrados.

Porém Silva et al. (2004) os dois padrões de expressão da c-erbB-2 tem significados distintos. Estes consideram uma forte demarcação da membrana como o padrão de expressão observado em neoplasias bem-diferenciadas ou em áreas bem diferenciadas do tumor, como na porção interna de pérolas córneas, a despeito de ser o padrão de marcação encontrado no epitélio normal adjacente às lesões neoplásicas. E consideram a expressão predominantemente citoplasmática característica de células e tumores indiferenciados. O que também foi notado por Aguiar et al. (2007).

Como trabalhamos eminentemente com amostras de biópsias incisionais (apenas 8 dos 65 casos eram peças cirúrgicas) não incluímos a graduação histológica como parâmetro clinico-patológico e por este motivo não pudemos analisar sua correlação com o padrão de expressão imunoistoquímica.

Outro fator que também influencia o padrão de marcação é o tipo de anticorpo utilizado, pois diferentes anticorpos apresentam sensibilidade e especificidade variadas para identificação desta proteína. Nos estudos avaliados foi constatada a utilização aleatória de mais de 5 tipos diferentes de anticorpos, entre mono ou policlonais de diversos fabricantes.

Para Oliveira et al. (2008) e Angiero et al. (2008) o estabelecimento do padrão de imunoexpressão com exata precisão e a padronização do anticorpo utilizado em análises imunoistoquímicas é fundamental para a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados e torna-se necessário em estudos futuros.

Para Aguiar et al. (2007) a definição de parâmetros biológicos em biópsias incisionais pode sugerir um tratamento local mais agressivo na primeira oportunidade cirúrgica. Visto que o tratamento do carcinoma epidermóide de boca permanece prioritariamente cirúrgico, e que decisão a cerca da ampliação do esvaziamento cervical contribui fundamentalmente no prognóstico dos pacientes com CEB, a definição de parâmetros em biópsias incisionais contribuiriam em sobremaneira no prognóstico dos pacientes.

São poucos os estudos que utilizaram exclusivamente amostras de biópsias incisionais em seus experimentos, como os realizados por Sugiura et al. (2009), Oliveira et al. (2008) e Aguiar et al. (2007). A grande maioria dos trabalhos não deixa claro se utilizaram espécimes de biópsias ou peças de ressecção cirúrgica ou também o fizeram em conjunto.

Não observamos variação entre o padrão de marcação da c-erbB-2 nas amostras de biópsias ou peças cirúrgicas. Mas considerando a possibilidade de influência deste dado nos nossos resultados, refizemos as análises estatísticas considerando apenas os casos avaliados de espécimes de biópsia, porém não observamos variação nos resultados encontrados.

Chen et al. (2004) relataram que sensibilidade na detecção da c-erbB-2 em amostras emblocadas em parafinadas diminui com o tempo de armazenamento, podendo serem subestimadas, e sugerem a utilização de espécimes a fresco para maior fidelidade na identificação desta proteína ou gene correspondente.

Talvez um grande exemplo da influência deste fator na divergência dos resultados relatados na literatura foi observado no estudo prospectivo desenvolvido por Parise Júnior et al. (2004). As autores analisaram a expressão por imunoistoquimica da c-erbB-2 em amostras a fresco de CEB e mucosas normais adjacentes e detectaram uma diminuição da imunomarcação desta proteína nas amostras de CEB quando comparadas com a mucosa normal, tendo considerado positivas apenas as marcações expressas em membrana. Este resultado diverge de todos os demais relatados.

A identificação de biomarcadores prognósticos detectados por imunoistoquímica, apesar de demonstrar-se mais viável em virtude da fácil execução e possibilidade de aplicação clínica, apresenta inúmeros fatores inerentes à técnica que dificultam sua determinação, o que às vezes impossibilita a comparação entre estudos com o mesmo marcador.

O-charoenrat et al. (2002) e Angiero et al. (2008) atribuem alguns fatores adicionais para a divergência dos resultados observados na avaliação da c-erbB-2 como indicador de prognóstico em pacientes com CEB. São diferenças observadas de acordo com a técnica utilizada como: imunoistoquímica ou hibridização usa de diferentes anticorpos, pré-tratamentos diferentes dos cortes analisados. Os autores concluiram ainda que apesar do aumento da expressão imunoistoquimica da c-erbB-2 em CEB ser observado em vários estudos, nem sempre este foi correlacionado significantemente com os parâmetros clinico-patológicos examinados.

Quanto à expressão imunoistoquimica da vimentina, apesar de muitos trabalhos associarem a sua identificação apenas em peças cirúrgicas, em virtude da necessidade de avaliação do pólo de invasão tumoral, em nosso trabalho foi

detectado um alto índice de expressão positiva, totalizando 55,4% dos 65 casos avaliados.

Não observamos correlação estatisticamente significante entre a imunoexpressão da vimentina e a sobrevida dos pacientes porém detectamos uma forte tendência à correlação com o índice N do estadiamento clínico TNM (p=0,055). Dentre as demais variáveis clínicas estudadas não observamos correlação com a expressão imunoistoquímica de vimentina.

Quanto ao padrão de imunoexpressão, esta foi observada de forma intensa, principalmente nas células tumorais com padrão acantolítico. Na grande maioria de amostras teciduais no qual o padrão coeso da arquitetura epitelial ainda estava mantido, seja na forma de cordões ou principalmente ilhas, a expressão da vimentina não foi observada.

A expressão concomitante de genes epiteliais e mesenquimais associada à perda da adesão celular e aquisição de mudanças no fenótipo celular são evidências claras da ativação de subprogramas da transição epitélio-mesenquimal. O gene VIM, codificante da proteína vimentina é usualmente restrito a células de origem mesenquimal, apresentando uma notável expressão em linhagens de carcinomas durante a transição epitélio-mesenquimal. Sendo a presença da vimentina muitas vezes em pontos focais na face basal das células neoplásicas um forte indicativo da transição epitélio-mesenquimal. (MOLINOLO et al., 2009).

A detecção por imunoistoquímica da vimentina em linhagens celulares de carcinomas de mama, bexiga e colo de útero tem sido associada a um aumento na capacidade de invasão e metástase. Porém esta é descrita como um evento tardio da carcinogênese, após a desregulação de inúmeros oncogenes e genes supressores de tumor (GUARINO; RUBINO; BALLABIO, 2007).

Também observamos uma tendência maior à marcação imunoistoquimica para a vimentina nos casos em estágios mais avançados da doença (estágio III e IV) entretanto, esta correlação não foi estatisticamente significante como demonstra a Tabela 5.2. Talvez este dado não seja significante pela grande maioria dos casos estudados compreenderem pacientes nos estágios III e IV.

Nos casos avaliados no presente estudo, apesar do alto índice de expressão da c-erbB-2 e da vimentina, estas não apresentaram correlação estatisticamente significante entre si ou com parâmetros clínicos, como observado nas Tabelas 5.3 e 5.4 (p=0,351 pelo teste de correlação de Spearman e p=0,344 pelo teste de correlação de variáveis qui-quadrado).

Acreditamos que os inúmeros fatores citados como influentes na definição da expressão por imunoistoquímica da c-erbB-2 possam também ter interferido na possível associação com a expressão da vimentina.

Quanto à sobrevida dos pacientes deste estudo, não observamos correlação estatisticamente significante com nenhuma das duas proteínas avaliadas como descrito na tabela e observado nos Gráficos 5.7 e 5.8.

Segundo Muñoz-Guerra et al. (2005), para a identificação biomarcadores prognósticos que identifiquem lesões que tem maior propensão à recorrência ou que levarão o paciente a óbito independente da terapia empregada o ideal é desenvolver pesquisas com pacientes em estágio inicial da doença, pois lesões avançadas podem requerer tratamentos locais mais agressivos ou ainda terapias adjuvantes o que com certeza por si só já influencia o prognóstico.

Entretanto a disponibilidade de uma amostra significativa de casos em estágios I e II é extremamente difícil, pois a amostra estudada é um reflexo dos

índices epidemiológicos desta doença no qual a maior parte dos casos é diagnosticada em fase tardia.

Em relação à metodologia empregada, também observamos que também existem divergências entre os métodos de avaliação da imunomarcação. A grande maioria de estudos que avaliam biomarcadores prognósticos imunoistoquimicos fazem a análise da expressão de forma semi-quantitativa. No entanto foi observada grande variância nos parâmetros de intensidade e distribuição da imunoexpressão empregados.

O critério de avaliação imunoistoquimica adotado neste trabalho demonstrou-se fácil e reprodutível, no entanto, considerando as dificuldades para a definição de positividade da reação imunoistoquímica para a detecção da c-erbB-2 acreditamos que este também possa ter influenciado nos resultados.

Com o propósito de aumentar a força das análises estatísticas empregadas neste estudo muitas variáveis clínicas foram agrupadas. Estratégia também utilizada em outros estudos relatados (ALBUQUERQUE et al., 2003; IBRAHIM et al., 1997; KHAN et al., 2002).

Alguns autores acreditam que o prognóstico do CEB seja pior em pacientes mais velhos, entretanto atribuem esta diferença ao alto índice de co-morbidades e a fatores debilitantes comumente presentes nesta faixa etária e não a um comportamento biológico distinto da neoplasia em pacientes de mais idade (ARDUINO et al., 2008).

Oliveira et al. (2008) encontraram correlação entre a idade e o prognóstico dos pacientes e observaram melhor prognóstico em pacientes com menos do que 60 anos. Porém, estes atribuem a falta de consenso em relação à identificação da idade como fator prognóstico independente à falta de padronização para agrupamento da

faixa etária e sugerem o critério adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que define a faixa etária de 60 anos como referência, em virtude desta idade marcar o início do terceiro estágio da vida em países desenvolvidos.

Em nosso estudo, após determinadas as idades mínima e máxima e calculada a idade média dos pacientes estes foram agrupados em $\leq$ 60 anos e > 60 anos, porém não foi observada correlação significante com o prognóstico dos pacientes.

Quanto à correlação das demais variáveis clínicas estudadas com a sobrevida dos pacientes, a análise univariada dos 65 casos da amostra revelaram que: sexo (P=0,004), fumo (P=0,026), índice N do estadiamento TNM (P=0,002), estágio clínico da doença (P=0,049) e tipo de tratamento aplicado (P=0,002) influenciaram significantemente o desfecho clínico dos pacientes.

As variáveis que demonstraram significância pela análise univariada foram avaliadas pela análise multivariada de riscos proporcionais de Cox, com o intuito de verificar o impacto prognóstico isolado de cada uma destas na sobrevida dos pacientes. De acordo com os resultados observados, podemos concluir que a variável sexo foi o único parâmetro que isoladamente demonstrou correlação com o prognóstico dos pacientes.

Estas correlações observadas corroboram com os relatados por outros autores. No entanto, a identificação do sexo como parâmetro prognóstico independente demonstrou-se divergente dos demais (ARDUINO et al., 2008; MASSANO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; SCULLY; BAGAN, 2009c).

Para melhor avaliação da influência do tipo de tratamento executado com as demais variáveis clínicas incluindo a imunoexpressão das proteínas avaliadas, os grupos cirúrgico e não-cirúrgico foram avaliados separadamente, porém também

não houve correlação significante entre a expressão imunoistoquímica da vimentina e do c-erbB-2 com a sobrevida dos pacientes nos dois grupos avaliados em separado.

Os achados contraditórios na literatura estão de acordo com a complexidade e heterogenicidade da progressão tumoral do CEB. Portanto, é pouco provável que apenas um único parâmetro seja identificado como marcador prognóstico ideal. A avaliação de múltiplos fatores prognósticos em conjunto, incluindo possíveis marcadores biológicos que caracterizem o comportamento tumoral, pode ser necessária para estimar o curso da doença individualmente (SCULLY; BAGAN, 2009b)

Para Oliveira et al. (2008), apenas poucos estudos recentes avaliaram fatores prognósticos do CEB em grupos homogêneos de pacientes na tentativa de eliminar a influência de fatores clínicos, patológicos e demográficos. Para maior confiabilidade nos resultados a amostra deve ser suficientemente grande, com pacientes em diferentes estágios clínicos e com lesões em diferentes sítios anatômicos, porém apenas de cavidade oral, e se possível distribuídos homogeneamente. Baseado nestes critérios e com o intuito de identificar este perfil de amostra, muitos trabalhos relatados são estudos multicêntricos. Porém diferentes centros de tratamento do câncer adotam estratégias de tratamento muitas vezes distintas.

Como também foi observado neste estudo, diferentes modalidades de tratamento, por si só afetam o curso clínico da doença e por conseqüência a sobrevida dos pacientes, portanto acreditamos que para isolar esta variável devemos delinear estudos com propostas terapêuticas definidas e homogêneas de acordo com outros parâmetros clínicos.

Considerando todos os fatores que de alguma forma influenciaram os nossos resultados, seja fatores relacionados à proteína estudada, ou à metodologia empregada, podemos concluir que os resultados observados foram insuficientes para identificar a c-erbB2 ou a vimentina como biomarcadores prognósticos assim como para descartá-las totalmente deste papel, persistindo o desafio da obtenção de marcadores que auxiliem na predição do comportamento clínico e indiquem propostas terapêuticas melhor direcionadas para pacientes com Carcinoma Epidermóide de Boca.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

1. A imunoexpressão das proteínas c-erbB-2 e vimentina quando presente nas células neoplásicas apresentava-se predominantemente citoplasmática.

2. Não houve correlação estatisticamente significante entre a imunoexpressão de c-erbB-2 e as variáveis clínicas nos casos estudados. Porém houve uma forte tendência à correlação da imunoexpressão de vimentina com o índice N (TNM).

3. Não houve correlação estatisticamente significante entre a expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina entre si.

4. Não houve correlação estatisticamente significante entre a expressão imunoistoquímica das proteínas c-erbB-2 e vimentina e a sobrevida global dos pacientes estudados.

5. Houve correlação estatisticamente significante entre as variáveis clinicas sexo, fumo, índice N, estadiamento clínico e tipo de tratamento aplicado e a sobrevida global dos pacientes sendo que apenas com a variável sexo houve correlação de maneira independente.

REFERÊNCIAS[1]

Aguiar AF Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. Oral Oncol 2007;43(6):593-601.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Biologia molecular da célula. 3 ed. Artes Médicas, 1997. p. 956-7.

Albuquerque RL Jr, Miguel MC, Costa AL, Souza LB. Correlation of c-erbB-2 and S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in oral squamous cell carcinoma. Int J Exp Pathol 2003;84(2):259-65.

American Cancer Society. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 5th ed. Chicago: Lippincott- Ravan;1997.

Angiero F, Sordo RD, Dessy E, Rossi E, Berenzi A, Stefani M. Comparative analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) in squamous cell carcinoma of the tongue: does over-expression exist? And what is its correlation with traditional diagnostic parameters? J Oral Pathol Med 2008;37(2):145-50.

Araújo RF Jr, Barboza CA, Clebis NK, Moura SA, Lopes CAL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2008;13(6):E344-7.

Araujo VC, Pinto Júnior DS, Sousa SO, Nunes FD, de Araújo NS. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 1993;250(2):105-9.

Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, Bertolusso G, Gandolfo S. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. J Oral Maxillofac Surg 2008;66(8):1570-9.

1 De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1994.

Bagan JV, Scully C. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. Oral Oncol In press Feb. 2009.

Bei R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M, et al. Co-localization of multiple erbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. J Pathol 2001;195(3):343-8.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;17(6835):355-65.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Diseases 1998;4(2):70-7.

Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NHA, Sample D, Hankins P, Smith TL, Wolf PJ. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? Head Neck 1998; 20(2):138-44.

Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, da Silva LE, da Fonseca EC, de Faria PA, Dias FL, Lourenço SQ. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2009;45(3):225-33.

Chen CH, Lin YS, Lin CC, Yang YH, Ho YP, Tsai CC. Elevated serum levels of a c-erbB-2 oncogene product in oral squamous cell carcinoma patients. J Oral Pathol Med 2004;33(10):589-94.

Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, Campbell CM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Alpha B-crystallin, a new independent marker

for poor prognosis in head and neck cancer. Laryngoscope 2005;115(7):1239-42.

Citri A, Alroy I, Lavi S, Rubin C, Xu W, Grammatikakis N, Patterson C, Neckers L, Fry DW, Yarden Y. Drug induced ubiquitylation and degradation of ErbB receptor tyrosine kinases: implications for cancer therapy. EMBO J 2002;21(10):2407-17.

Clark JR, Naranjo N, Franklin JH, Almeida J, Gullane PJ. Established prognostic variables in NO oral carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2006;135(5):748-53.

Costa AVC, Parise O Jr, Hors CP, Melo MPC, Silva AP, Garicochea B. The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. Exp Mol Pathol 2007;82(1):53-7.

Ettl T, Schwarz S, Kleinsasser N, Hartmann A, Reichert TE, Driemel O. Overexpression of EGFR and absence of C-KIT expression correlate with poor prognosis in salivary gland carcinomas. Histopathology 2008;53(5):567-77.

Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. Oral Oncol In press Feb 2009.

Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. Oral Oncol 2009;45(4-5):440-6.

Gouvêa AP, Fernandes JRM, Olson SJ, Brandão EC, Leite MT, Gobbi H. HER-2/neu immunoreactivity in invasive mammary carcinomas: a comparative study using monoclonal and polyclonal antibodies including the HercepTest™. J Bras Patol Med Lab 2004;40(1):27-32.

Goy J, Hall SF, Feldman-Stewart D, Groome PA. Diagnostic delay and disease stage in head and neck cancer: a systematic review. Laryngoscope 2009;119(5):889-98.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004;4(5):361-70.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology 2007;39(3):305-18.

Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. Int J Biochem Cell Biol 2007;39(12):2153-60.

Guerra ENS; Paula ÉC, Oliveira JC, Pinto Júnior DS, Araújo VC, Araújo NS. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização/Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TNM classification and location. Rev Bras Cancerol 2005;51(1):31-7.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100(1):57-70.

Hu L, Lau SH, Tzang CH, Wen JM, Wang W, Xie D, Huang M, Wang Y, Wu MC, Huang JF, Zeng WF, Sham JS, Yang M, Guan XY. Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. Oncogene 2004;23(1):298-302.

Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, Jiang J, Howat WJ, Ali S, Carroll JS. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. Nature 2008;456(7222):663-6.

Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. Cancer Res 2004;64(9):3171-8.

Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of head and neck. Anticancer Res 1997;17(2):4539-46.

Islam S, Kim JB, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KR. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. J Cell Biochem 2000;78(1):141-50.

Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. Exp Cell Res 2007;313(10):2050-62.

Jeremić B, Miličić B. Pretreatment prognostic factors of survival in patients with locally advanced nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiation therapy with or without concurrent chemotherapy. Am J Clin Oncol 2009; 32(2):163-8.

Khademi B, Shirazi FM, Vasei M. The expression of p53, c-erbB-1 e c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head an neck tumors. Cancer Lett 2002;184(2):223-30.

Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D, Haffty BG. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2002;8(2):540-8.

Kim MA, Lee HS, Lee HE, Kim JH, Yang HK, Kim WH. Prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma. Histopathology 2009;54(4):442-51.

Laimer K, Blassnig N, Spizzo G, Kloss F, Rasse M, Obrist P, Schäfer G, Perathoner A, Margreiter R, Amberger A. Prognostic significance of 14-3-3sigma expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Oral Oncol 2009;45(2):127-34.

Lee JI, Jin BH, Kim MA, Yoon HJ, Hong SP, Hong SD. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;107(5):678-84.

Leemans C, Tiwari R, Nauta J, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastasis as a prognostic factor. Cancer 1994;73(1):187.

Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Chen IH, Huang SF, Cheng AJ, Yen TC. Survival in squamous cell carcinoma of the oral cavity: differences between pT4 NO and other stage IVA categories. Cancer 2007;110(3):564-71.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(3):776-81.

Long JL, Strocker AM, Wang MB, Blackwell KE. EGFR expression in primary squamous cell carcinoma of the thyroid. Laryngoscope 2009;119(1):89-90.

Maddox WA. Vicissitudes of head and neck cancer. Am J Surg 1984;148(4):428–32.

Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. Cancer 2008;112(9):2088-100.

Manne U, Srivastava RG, Srivastava S. Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment. Drug Discov Today 2005;10(14):965-76.

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.

Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, Kimura ET. Marcadores biológicos de tumores tiroidianos. Arq Bras Endocrinol Metab 2004; 48(1):114-25.

McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. Biochem Biophys Res Commun 2007;360(1):109-14.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. Oral Oncol 2009;45(4-5):324-34.

Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernández-Contreras ME, Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicatior of poor prognosis. Cancer 2005;103(5):960-9.

Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. Oral Oncol 2003;39(3):213-21.

O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2002;38(7):627-40.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JP, Simões AL, Matteo MA, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;106(5):685-95.

Panizza B. Prognostic factors and the treatment of the negative neck in oral carcinoma. ANZ J Surg 2009;79(1-2):7-8.

Parise Junior O, Carvalho LV, Miguel RE, Kowalski LP. Prognostic impact of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. Sao Paulo Med J 2004;122(6):264-8.

Patel RS, Clark JR, Dirven R, Wyten R, Gao K, O'Brien CJ. Prognostic factors in the surgical treatment of patients with oral carcinoma. ANZ J Surg 2009;79(1-2):19-22.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. J Can Dent Assoc 2007;73(4):339-44.

Petersen PE. Oral cancer prevention and control: the approach of the World Health Organization. Oral Oncol 2009;45(4-5):454-60.

Pinto Jr DS. Critérios de avaliação do prognóstico – Tipo histológico, marcadores imuno-histoquimicos – em biópsias de carcinoma epidermóide de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1991.

Porta M, Fernandes E, Alguacil J. Semiology, proteomics and the early detection of symptomatic câncer. J Clin Epidemiol 2003;56(2):815-19.

Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, et al. Survival following primary surgery for oral cancer. Oral Oncol 2009;45(3):201-11.

Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Kaur P, et al.

Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. Clin Cancer Res 2004;10(7):2466-72.

Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol 2001;12(1):53-8.

Salomão C. Fatores de prognóstico no carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Sato Y, Nascimento CF; Ferreira SS, Fregnani JHTG, Soares FA. Análise da expressão imuno-histoquímica de c-erbB-2 e EGFR em carcinoma epidermóide de esôfago: immunohistochemical expression of c-erbB-2 and EGFR in esophageal squamous cell carcinoma. J Bras Patol Med Lab 2007;43(4):275-83.

Sawyers CL. The cancer biomarker problem. Nature 2008;452(7187):548-52.

Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma overview. Oral Oncol 2009a;45(4-5):301-8.

Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. Oral Dis In press Apr. 2009b.

Scully C, Bagan JV. Recent advances in oral oncology 2008: squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. Oral Oncol In press Feb. 2009c.

Serrano-Olvera A, Dueñas-González A, Gallardo-Rincón D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. Cancer Treat Rev 2006;32(3):180-90.

Severino P, Alvares AM, Michaluart Jr P, Okamoto OK, Nunes FD, Moreira-Filho CA, Tajara EH. Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites. BMC Res Notes 2008;13(1):113-9.

Shaw RJ, McGlashan G, Woolgar JA, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED, et al.

Prognostic importance of site in squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. Br J Oral Maxillofac Surg. In press Dec. 2008.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma: a clinicopathological study. Oral Oncol 2004; 40(7):688-96.

Silva SD, Cunha IW, Nishimoto IN, Soares FA, Carraro DM, Kowalski LP, et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol. In press Apr. 2009.

Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CA, Kowalski LP, et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. Oral Oncol 2008;44(5):484-90.

Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, et al. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14(22):7430-7.

Specenier PM, Vermorken JB. Neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: should it be revisited? Cancer Lett 2007;256(2):166-77.

Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, Shirasuna K. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. Int J Oncol 2009;34(3):673-80.

Sun Z, Sood S, Li N, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 tyrosine kinases. Oral Oncol 2008;44(7):652-7.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2002;2(6):442-54.

Uehara M, Sano K, Ikeda H, Nonaka M, Asahina I. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. Oral Oncol 2009;45(3):241-6.

Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. Oral Oncol 2004;40(5):532-7.

Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. Oral Oncol 2008;44(4):315-24.

Van der Schroeff MP, Baatenburg de Jong RJ. Staging and prognosis in head and neck cancer. Oral Oncol 2009;45(4-5):356-60.

Veiga LCS, Bergamo NA, Kowalski LP, Rogatto SR. Classical and molecular cytogenetic analysis in head and neck squamous cell carcinomas. Genet Mol Biol 2003;26(2):121-8.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol 2009;45(4-5):309-16.

Woolgar JA, Triantafyllou A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. Oral Oncol 2009;45(4-5):361-85.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2006;42(3):229-39.

Wu CH, Tu HF, Gong NR, Chen YW, Liu CJ, Kao SY. The Val allele of HER-2 codon 655 predicts the progression of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. In press Oct. 2008.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ. Combination of EGFR, HER-2/neu and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin Cancer Res 1999;5(2):4164-74.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 1997;3(1):3-9.

Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. Gastric Cancer 2005;8(2):86-94.

APENDICE A – Dados clínicos e imunoistoquímicos dos 65 pacientes com carcinoma epidermóide de boca cujas amostras foram utilizadas para os experimentos. N: 0 negativo e 1 positivo; Sobrevida: em meses

CASO	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	LOCAL	T	N	TRATAMENTO	DESFECHO	SOBREVIDA	VIMENTINA	c-erbB-2
1	MASC	53	SIM	SIM	MUCOSA JUGAL	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	9	POSITIVO	NEGATIVO
2	MASC	64	SIM	SIM	LINGUA	3	0	CIRURGICO	OBITO	4	POSITIVO	POSITIVO
3	FEM	75	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ACOMP.	62	NEGATIVO	POSITIVO
4	MASC	33	NÃO	INDET.	LINGUA	3	0	CIRURGICO	ACOMP.	63	NEGATIVO	POSITIVO
5	MASC	54	SIM	SIM	LINGUA	1	0	CIRURGICO	OBITO	32	POSITIVO	POSITIVO
6	FEM	66	NÃO	NÃO	PALATO	4	1	CIRURGICO	ACOMP.	63	NEGATIVO	NEGATIVO
7	MASC	56	NÃO	NÃO	LINGUA	2	0	CIRURGICO	ACOMP.	49	NEGATIVO	POSITIVO
8	MASC	52	SIM	SIM	REBORDO	4	0	CIRURGICO	OBITO	39	NEGATIVO	POSITIVO
9	FEM	74	SIM	SIM	REBORDO	4	0	CIRURGICO	ACOMP.	26	POSITIVO	POSITIVO
10	MASC	64	SIM	SIM	ASSOALHO	1	1	CIRURGICO	ACOMP.	1	NEGATIVO	POSITIVO
11	MASC	53	SIM	SIM	REBORDO	4	1	CIRURGICO	OBITO	1	NEGATIVO	POSITIVO
12	MASC	66	SIM	SIM	PALATO	4	0	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	1	POSITIVO	NEGATIVO
13	FEM	63	SIM	NÃO	LINGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	1	POSITIVO	POSITIVO
14	MASC	62	SIM	SIM	REBORDO	4	0	CIRURGICO	OBITO	3	NEGATIVO	POSITIVO
15	MASC	66	NÃO	NÃO	LINGUA	3	0	CIRURGICO	OBITO	10	NEGATIVO	NEGATIVO
16	FEM	64	SIM	SIM	TRIGONO	4	0	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	14	POSITIVO	NEGATIVO
17	MASC	60	SIM	SIM	TRIGONO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	18	POSITIVO	NEGATIVO
18	FEM	69	NÃO	NÃO	MUC. JUGAL	3	0	CIRURGICO	OBITO	72	POSITIVO	POSITIVO
19	FEM	79	SIM	NÃO	REBORDO	4	0	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	8	POSITIVO	POSITIVO
20	MASC	56	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	OBITO	3	POSITIVO	POSITIVO

Cont.

CASO	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	LOCAL	T	N	TRATAMENTO	DESFECHO	SOBREVIDA	VIMENTINA	c-erbB-2
21	MASC	79	SIM	SIM	TRIGONO	2	0	CIRURGICO	OBITO	4	POSITIVO	POSITIVO
22	MASC	41	NÃO	NÃO	PALATO	2	1	CIRURGICO	OBITO	22	NEGATIVO	POSITIVO
23	MASC	75	SIM	SIM	ASSOALHO	3	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	5	NEGATIVO	POSITIVO
24	MASC	43	NÃO	NÃO	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	ÓBITO	2	POSITIVO	POSITIVO
25	MASC	53	SIM	SIM	LÍNGUA	3	1	CIRURGICO	ÓBITO	6	POSITIVO	POSITIVO
26	FEM	85	SIM	NÃO	LINGUA	3	0	CIRURGICO	ACOMP.	41	NEGATIVO	POSITIVO
27	FEM	70	SIM	NÃO	LÍNGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	5	POSITIVO	POSITIVO
28	MASC	45	SIM	SIM	ASSOALHO	2	1	CIRURGICO	ÓBITO	45	POSITIVO	POSITIVO
29	MASC	69	SIM	SIM	LINGUA	3	0	CIRURGICO	ÓBITO	23	POSITIVO	NEGATIVO
30	MASC	68	SIM	SIM	ASSOALHO	3	0	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	1	POSITIVO	NEGATIVO
31	MASC	73	SIM	SIM	LÍNGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	14	POSITIVO	POSITIVO
32	MASC	73	SIM	SIM	LINGUA	2	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	10	POSITIVO	POSITIVO
33	FEM	63	SIM	NÃO	LÍNGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ACOMP.	59	POSITIVO	POSITIVO
34	MASC	74	SIM	SIM	LINGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	11	NEGATIVO	NEGATIVO
35	FEM	84	SIM	NÃO	LINGUA	3	1	CIRURGICO	ÓBITO	5	NEGATIVO	POSITIVO
36	FEM	27	NÃO	NÃO	LÍNGUA	2	0	CIRURGICO	ACOMP.	59	POSITIVO	NEGATIVO
37	FEM	74	SIM	SIM	LÍNGUA	3	1	CIRURGICO	OBITO	1	POSITIVO	POSITIVO
38	MASC	71	SIM	NÃO	LÍNGUA	3	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	2	POSITIVO	POSITIVO
39	MASC	71	SIM	SIM	LINGUA	2	0	CIRURGICO	ACOMP.	52	POSITIVO	POSITIVO
40	MASC	60	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	ÓBITO	3	NEGATIVO	POSITIVO

Continuação

CASO	SEXO	IDADE	FUMO	ÁLCOOL	LOCAL	T	N	TRATAMENTO	DESFECHO	SOBREVIDA	VIMENTINA	c-erbB-2
41	MASC	25	NÃO	NÃO	LINGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	12	NEGATIVO	POSITIVO
42	FEM	93	SIM	NÃO	LINGUA	3	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	5	NEGATIVO	NEGATIVO
43	FEM	43	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	ACOMP.	57	POSITIVO	POSITIVO
44	MASC	72	SIM	NÃO	LINGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	14	NEGATIVO	POSITIVO
45	MASC	39	SIM	NÃO	LINGUA	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	1	POSITIVO	NEGATIVO
46	MASC	57	INDET.	INDET.	PALATO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	3	NEGATIVO	NEGATIVO
47	MASC	57	INDET.	INDET.	ASSOALHO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	2	NEGATIVO	POSITIVO
48	MASC	66	INDET.	INDET.	ASSOALHO	4	1	NÃO CIRÚRGICO	OBITO	1	NEGATIVO	POSITIVO
49	MASC	67	INDET.	INDET.	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	OBITO	8	POSITIVO	POSITIVO
50	MASC	38	SIM	SIM	LINGUA	1	0	CIRURGICO	OBITO	36	POSITIVO	POSITIVO
51	MASC	37	INDET.	INDET.	ASSOALHO	2	0	CIRURGICO	ACOMP.	67	NEGATIVO	NEGATIVO
52	MASC	74	SIM	SIM	LINGUA	3	1	CIRURGICO	OBITO	1	NEGATIVO	NEGATIVO
53	MASC	53	SIM	SIM	TRIGONO	3	1	CIRURGICO	OBITO	14	NEGATIVO	NEGATIVO
54	FEM	40	SIM	SIM	TRIGONO	3	0	CIRURGICO	ACOMP.	36	POSITIVO	NEGATIVO
55	MASC	59	SIM	SIM	ASSOALHO	3	1	CIRURGICO	OBITO	10	NEGATIVO	NEGATIVO
56	MASC	65	SIM	SIM	ASSOALHO	4	0	CIRURGICO	ACOMP.	46	POSITIVO	POSITIVO
57	MASC	52	SIM	NÃO	LINGUA	3	1	CIRURGICO	OBITO	5	POSITIVO	NEGATIVO
58	FEM	35	SIM	NÃO	REBORDO	3	1	CIRURGICO	OBITO	4	POSITIVO	NEGATIVO
59	FEM	40	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	OBITO	34	POSITIVO	POSITIVO
60	FEM	90	NÃO	NÃO	LINGUA	3	0	CIRURGICO	ACOMP.	17	POSITIVO	POSITIVO
61	MASC	68	SIM	NÃO	ASSOALHO	3	1	CIRURGICO	ACOMP.	19	NEGATIVO	NEGATIVO
62	FEM	70	SIM	NÃO	TRIGONO	3	1	CIRURGICO	ACOMP.	10	NEGATIVO	NEGATIVO
63	FEM	78	INDET.	INDET.	LINGUA	3	0	CIRURGICO	ACOMP.	20	POSITIVO	NEGATIVO
64	MASC	74	INDET.	INDET.	LINGUA	3	1	CIRURGICO	ACOMP.	1	NEGATIVO	NEGATIVO
65	MASC	70	SIM	SIM	ASSOALHO	4	1	CIRURGICO	OBITO	1	NEGATIVO	NEGATIVO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 190/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"EXPRESSÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS VIMENTINA, CtBP E c-erbB-2 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES BUCAIS EM CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PROGNÓSTICO"**, de responsabilidade da Pesquisadora, **TESSA DE LUCENA BOTELHO**, sob orientação do Professor Doutor **DÉCIO DOS SANTOS PINTO JÚNIOR**

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, 04 de dezembro de 2007

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O.