UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DIEGO MAURICIO BRAVO CALDERÓN

**Expressão do receptor beta-2 adrenérgico
em carcinoma espinocelular de boca e sua
associação com a evolução clínica tumoral**

BAURU
2011

DIEGO MAURICIO BRAVO CALDERÓN

**Expressão de receptor beta-2 adrenérgico em carcinoma
espinocelular de boca e sua associação com a evolução clínica
tumoral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Patologia Bucal.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira
Versão corrigida.

BAURU
2011

B721e Bravo, Diego Mauricio Calderón
Expressão de receptor beta-2 adrenérgico em carcinoma espinocelular de boca e sua associação com a evolução clínica tumoral/ Diego Mauricio Bravo Calderón. – Bauru, 2011.

127p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja o programa.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

Protocolo nº: 1385/10

Data: 13 de abril de 2010.

DADOS CURRICULARES

Diego Mauricio Bravo Calderón

02/06/1984	Nascimento em Cuenca – Equador
2001 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuenca – Equador
2007 – 2008	Aperfeiçoamento em Prótese Sobre Implante pelo Instituto de Ensino Odontológico, Bauru – SP
2008 – 2008	Aperfeiçoamento em Implantodontia pelo Instituto de Ensino Odontológico, Bauru – SP
2008 – 2008	Participação do Programa de Capacitação Profissional em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2007 – 2009	Curso de Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
2009 – 2011	Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração: Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabajo, a las personas que son motivo
de mi felicidad y mi fuerza*

A mis papas, **Manuel Bravo e Leonor Calderón**

A mis hermanos, **Manolo e Maribel Bravo Calderón**

A mis cuñados, **Mery Encalada e Cristian Mora**

A mis sobrinos, **María José, Manolo Esteban,
Cristian Sebastián y Gabriel Estuardo**

AGRADECIMENTOS

A **Dios,**

por el bienestar de mi familia y por la más grande oportunidad de mi vida.

A mis papas, **Manuel Bravo e Leonor Calderón,**

por el apoyo y amor incondicional y, por enseñarme que lo más valioso del mundo es la familia.

A mis hermanos, **Manolo e Maribel Bravo Calderón,**

por estar presentes en todos los momentos de mi vida y por los incentivos, cariño y paciencia entregados a lo largo de la consecución de mis objetivos. Gracias también, por otorgarme el motivo de mi diario sonreír, mis sobrinos.

A **Rosa,**

por cuidar de mí desde mi niñez y ahora por cuidar de mi familia durante mi ausencia,

A minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira,**

pela orientação deste trabalho, pela confiança e as oportunidades em mim depositadas, pelo altruísmo com que me ensina ao longo destes dois anos, tudo o quanto sabe da Patologia e da vida. Além de tudo obrigado pela amizade e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** pelo respeito, conhecimento, e amizade entregados ao longo do curso.

As funcionárias da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Maria Cristina Carrara Filippi e Fátima Aparecida Silveira** por fazer da minha estadia no Departamento uma experiência inesquecível, lotada de carinho e respeito.

Aos **professores, funcionários e alunos da Disciplina de Periodontia** da Faculdade de Odontologia de Bauru, por ter aportado a meu crescimento profissional.

A meus amigos e colegas que surgiram durante o curso de Pós-graduação, **Adriana dos Santos Caetano, Ana Regina Cassaroto, Aroldo dos Santos Almeida, Bruno Aiello Barbosa, Bruno Cavalini Cavenago, Carine Ervolino de Oliveira, Cristiane Carvalho, Eloisa Marchi dos Anjos, Érika Martins Pereira, Fernanda Mombrini Pigatti, Helinton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke, Kellen Cristina Tjioe, Maria Carolina Vaz Goulart, Maria Carolina Martins Mussi, Patrícia Freitas-Faria, Priscila Lie Toubouti, Ronald Ordinola Zapata, Simone Eloiza Sita Faustino, Sylvie Brener e Thais Priscila Biassi.**

Em especial a **Bruna Maria Rodrigues Vilardi, Taisa Maria Rodrigues Vilardi e Aldo del Carpio Perochena**, o tempo junto a vocês serviu para reconhecer o valor incalculável da amizade.

À família **Rodrigues Vilardi** por me permitir compartilhar junto a vocês a minha vida no Brasil, eu os considero a minha segunda família.

A meus amigos estrangeiros, em especial para **Ana Miriam Garrido de la Rosa, Carlos Franco Alvarez, Carlos Andres Villavicencio, German Santiago**

Bravo Vallejo, Johana Barreno Velin, Monica Brito Peñaloza e Santiago González por estar junto a mim durante minhas alegrias e tristezas, e por compartilhar comigo memoráveis momentos.

A **todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru.

A **todos os funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome de **Cybelle de Assumpção Fontes**.

A **todos os funcionários do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos** do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

A **todos os funcionários do Serviço do Arquivo Médico** do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

À química e farmacêutica **Suely Nonogaki**, do Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela orientação durante a realização da técnica imuno-histoquímica, assim como pelas sugestões realizadas.

A **todos os funcionários da Secretaria do Departamento de Anatomia Patológica** do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo e diretor do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente pela oportunidade da realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Gilles Landman**, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, por autorizar a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, por assumir a responsabilidade deste trabalho no interior do Hospital.

Ao **Prof. Dr. Aparecido Nilceu Marana**, Departamento de Computação. Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Bauru, pela valiosa colaboração na análise imuno-histoquímica tumoral automatizada, com base no programa desenvolvido na linguagem MATLAB.

A **todos os funcionários do Núcleo de Apoio ao Pesquisador**, Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, em especial ao **Prof. Dr. André Lopes Carvalho** e ao Bioestatístico **Cleyton Zanardo de Oliveira**, por compartilhar seus conhecimentos, assim como pelo auxílio durante a análise estatística e pelas sugestões feitas ao trabalho.

Aos **pacientes** do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira.**

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de seu presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.**

Ao Curso de Pós-graduação na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da sua coordenadora, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira.**

Ao Hospital do Câncer A. C. Camargo e à Fundação Antônio Prudente, na pessoa do seu presidente, **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani.**

À CAPES, pelo auxílio pecuniário.

Ao CNPq, pelo apoio técnico a pesquisa (Processo CNPq 500991/2010-3).

RESUMO

Os hormônios produzidos durante o estresse e seus receptores específicos têm sido amplamente envolvidos com a progressão do câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos receptores β_2 adrenérgicos pelas células malignas de carcinomas espinocelulares de boca (CEC) e sua correlação com as características clínicas, evolução e o prognóstico dos pacientes. Um total de 106 pacientes portadores de CEC de boca em estádios clínicos II, III e IV, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital de Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2000, foram analisados quanto aos dados demográficos, história clínica, localização e extensão do tumor, classificação pelo sistema TNM-UICC, tratamento e evolução tumoral. Analisaram-se também as características histopatológicas, índice de malignidade tumoral e a expressão imuno-histoquímica do receptor β_2 adrenérgico pelas células malignas no *front* de invasão tumoral. A associação da expressão do receptor β_2 adrenérgico e as variáveis clínicas ou microscópicas foi calculada pelo teste do qui quadrado ou teste exato de Fisher. As probabilidades de sobrevida global e específica por câncer em 5 e 10 anos foram calculadas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier, comparadas pelo teste de *long-rank* e pelo modelo de regressão múltiplo de Cox. A expressão do receptor β_2 adrenérgico foi detectada na membrana e no citoplasma das células malignas da maioria dos CECs de boca (72,6%) e, significativamente associada ao etilismo ($p=0,021$), tabagismo e etilismo simultâneo ($p=0,014$) e estadiamento T ($p=0,07$). Os pacientes cujos tumores demonstraram expressão positiva do receptor β_2 adrenérgico apresentaram maiores taxas de sobrevida global ($p=0,001$) e específica por câncer ($p=0,004$), quando comparadas aquelas dos pacientes com tumores com ausência da expressão desta proteína. Esses resultados sugerem que a expressão do receptor β_2 adrenérgico nas células malignas da região do *front* de invasão tumoral constitui um fator prognóstico favorável em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e pode ser utilizada como alvo de novas estratégias farmacológicas antineoplásicas.

Palavras-chave: Câncer de boca. Receptor β_2 adrenérgico. Estresse.

ABSTRACT

Expression of beta-2 adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma and its association with tumor clinical outcome

The stress related hormones and their specific receptors have been widely involved with cancer progression. The aim of this study was to evaluate the expression of $\beta 2$ adrenergic receptor by malignant cells in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its correlation with clinical characteristics, outcome and patients prognosis. A total of 106 patients with OSCC in clinical stages II, III and IV submitted to surgical treatment at the Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology Department, of the Cancer Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil, from 1970 to 2000, were analyzed for demographics data, clinical history, location, tumor extension, stage by the TNM-UICC, treatment and tumor outcome. In addition, we investigated the morphologic features, the histopathological malignant index and the immunohistochemical expression of $\beta 2$ adrenergic receptor by malignant cells of the invasive front of tumor. Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the association among $\beta 2$ adrenergic receptor expression and the clinical or morphologic variables. The probability of overall and cancer specific survival in 5 and 10 years were calculated by Kaplan-Meier method and the prognostic value of the clinical and morphologic variables was obtained by Cox regression model. Most of OSCCs (72,6%) showed the $\beta 2$ adrenergic receptor expression in cytoplasm and cell membrane of malignant cells. In OSCC, positive $\beta 2$ adrenergic receptor expression was significantly associated with alcoholism ($p=0.021$), simultaneous consumption of alcohol and tobacco ($p=0.014$) and T stage ($p=0.07$). OSCC patients with positive expression of $\beta 2$ adrenergic receptor showed higher rates of overall survival ($p=0.001$) and cancer specific ($p=0.004$) than those patients with tumors without expression of this protein. These results suggest that the $\beta 2$ adrenergic receptor expression by malignant cells in the invasive front of tumor is a favorable prognostic factor in patients with OSCC and can be used as a target for new anti-neoplastic pharmacological strategies.

Keywords: Oral cancer. $\beta 2$ adrenergic receptor. Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Vias de sinalização das respostas neuroendócrina e autônoma ao estresse; e seus principais efeitos no microambiente tumoral. (Adaptado de ANTONI et al., 2006) 33
- Figura 2 - Representação esquemática da ativação do receptor $\beta 2$ adrenérgico. A ativação do receptor $\beta 2$ adrenérgico resulta na dissociação citoplasmática da subunidade G α s da proteína G, que estimula a adenilciclase a clivar o ATP (trifosfato de adenosina) gerando o cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). O cAMP ativa a PKA (proteína quinase A) que fosforila diversos fatores de transcrição como o CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP) e o HIF-1 α (fator 1 α induzível por hipóxia). Além disso, a PKA pode induzir a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática. (Adaptado de ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009)..... 37
- Figura 3 - Determinação automática da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos CEC de boca com base na quantidade de pixels segmentados como imunopositivos para esta molécula, na região do *front* de invasão tumoral.
A = imagem do carcinoma espinocelular de boca com expressão negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas;
C = imagem do carcinoma espinocelular de boca com forte expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas;
B e D = resultados das segmentações das imagens A e C, respectivamente, obtidas automaticamente (em vermelho) das áreas positivamente imunomarcadas pelo anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico..... 59
- Figura 4 - Formulário utilizado na coleta dos dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com carcinoma

	espinocelular de língua, assoalho de boca, gengiva inferior e área retromolar em estádios clínicos II, III e IV.....	62
Figura 5 -	Carcinoma espinocelular de boca. Em A, observar padrão de invasão em cordões grossos e com intensa queratinização (HE 100X). Em B, CEC de boca pouco queratinizado e com padrão de invasão em cordões finos. (HE 200X).....	75
Figura 6 -	Em A, observar a infiltração perineural do CEC de boca (HE 400X). Em B, observar a infiltração óssea do CEC de boca com um padrão de invasão em cordões grossos (HE 200X).....	77
Figura 7 -	Expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas camadas da mucosa bucal (A, IHQ 100X). Em B, detalhe da ausência de imunomarcagem da camada basal (IHQ 400X).....	81
Figura 8 -	Expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas fibras musculares lisas de artéria de médio calibre (A, IHQ 400X) e nos ductos das glândulas salivares mucosas (B, IHQ 400X).....	83
Figura 9 -	Expressão negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico no CEC de boca (A, IHQ 100X). Em B, detalhe das células malignas e das artérias coradas pelo receptor $\beta 2$ adrenérgico (IHQ 200X).....	89
Figura 10 -	Expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico no CEC de boca (A, IHQ 100X). Em B, detalhe da pérola córnea negativa para o receptor $\beta 2$ adrenérgico (IHQ 200X).....	91
Figura 11 -	Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.....	95
Figura 12 -	Sobrevida específica por câncer dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Graduação de malignidade do <i>front</i> de invasão tumoral, de acordo com Bryne et al. (1989).....	55
Tabela 2 -	Distribuição de freqüência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	68
Tabela 3 -	Distribuição de freqüência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características clínicas e a história clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	70
Tabela 4 -	Distribuição de freqüência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo o tratamento e a evolução clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	71
Tabela 5 -	Distribuição de freqüência dos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo o sistema de graduação de malignidade, do <i>front</i> de invasão tumoral, de acordo com Bryne et al. (1989). Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	73
Tabela 6 -	Distribuição de freqüência dos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo as características histopatológicas e o comprometimento linfonodal. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	74
Tabela 7 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas nos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo variáveis demográficas e história clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	80
Tabela 8 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos carcinomas espinocelulares de boca, segundo estadiamento clínico, tratamento e evolução. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	86

Tabela 9 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo as variáveis microscópicas de comprometimento linfonodal cervical histopatológico e infiltração neoplásica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	87
Tabela 10 -	Análise de sobrevida global acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	94
Tabela 11 -	Análise de sobrevida global acumulada por meio do modelo de Cox dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	96
Tabela 12 -	Análise de sobrevida específica por câncer por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	97
Tabela 13 -	Análise de sobrevida global específica por câncer por meio do modelo de Cox dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.....	99

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Grau Celsius
β2	Beta 2
μm	Micrometro
μm ²	Micrometro quadrado
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADRB2	Gene do receptor beta 2 adrenérgico
Anti-CD31	<i>Antigens, Cluster of Differentiation 31</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
AVP	Arginina vasopressina
BSA	Soro albumina bovino
CA	Califórnia
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CEC	Carcinoma espinocelular
CECs	Carcinomas espinocelulares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase 2
CREB	<i>Cyclic AMP Response Element-Binding Protein</i> (Proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP)
CRF	Fator liberador de corticotrofina
Da	Dalton
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor para o Fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases 1/2</i> (MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular 1/2)
EUA	Estados Unidos da América
EZH 2	<i>Enhancer of Zeste 2</i> (proteína Realçadora do Zeste 2)
Gαs	Subunidade G alfa s da proteína G heterotrimérica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible Factor-1α</i> (Fator 1 α Induzível por Hipóxia)
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Illinois
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ImageJ	<i>Image Processing and Analysis in Java</i> (Programa para processamento e análise de imagens em Java)
MATLAB	<i>Matrix Laboratory</i> (Linguagem utilizada no programa desenvolvido para segmentação de imagens)
Mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimol
MMP-2	Metaloproteinases da matriz 2
MMP-9	Metaloproteinases da matriz 9
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MOASS	Morte sem evidência de recidiva de tumor primário
MOCA	Morte decorrente do tumor primário
MOCI	Morte por intercorrência cirúrgica
N	Classificação clínica dos linfonodos regionais
N+	Presença de linfonodos regionais palpáveis
N0	Ausência de linfonodos regionais palpáveis
NA	Não se aplica
NaN ₃	Azida sódica
NK	<i>Célula Natural Killer</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razão de Probabilidades)
<i>p</i>	Valor de teste estatístico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfatos)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A

pN	Classificação patológica dos linfonodos
pN+	Presença de metástase em linfonodos regionais, confirmada microscopicamente
pN0	Ausência de metástase em linfonodos regionais, confirmada microscopicamente
RGB	<i>Read, Green and Blue color model</i> (Modelo de cores vermelho, verde e azul)
RGH	Registro Geral Hospitar
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SCC-9	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 9
SCC-25	Células de carcinoma espinocelular de boca humano, linhagem 25
SP	Estado de São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Classificação dos tumores malignos
UICC	União Internacional Combate ao Câncer
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	Receptor para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 1
VEGFR-2	Receptor Para o Fator de crescimento endotelial vascular do tipo 2
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	RESPOSTA DO SISTEMA NERVOSO FRENTE AO ESTRESSE	31
2.2	ESTRESSE E CÂNCER	32
2.3	RECEPTOR β 2 ADRENÉRGICO	35
2.4	EXPRESSÃO DO RECEPTOR β 2 ADRENÉRGICO EM CÉLULAS MALIGNAS	38
3	PROPOSIÇÃO	45
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	51
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	52
4.3	VARIÁVEIS DO ESTUDO	52
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	54
4.4.1	Graduação da Malignidade Tumoral	54
4.4.2	Método Imuno-histoquímico	55
4.4.3	Avaliação Imuno-histoquímica do receptor β2 adrenérgico	57

4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4.6	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	61
4.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	61
5	RESULTADOS	65
5.1	CASUÍSTICA	67
5.2	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	67
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	71
5.3.1	Graduação da Malignidade Tumoral	72
5.3.2	Avaliação Imuno-Histoquímica	79
5.4	ANÁLISE DE SOBREVIDA	93
5.4.1	Análise da Sobrevida Global	93
5.4.2	Análise da Sobrevida Específica por Câncer	96
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO	125

1 – Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os tumores malignos não são estruturas isoladas num organismo, sendo assim, seu desenvolvimento e sua progressão são caracterizados pelas múltiplas interações entre as células neoplásicas e o seu meio ambiente. Estímulos externos são capazes de gerar mudanças genéticas que desencadeiam a transformação maligna das células, induzindo-as a começar um processo dinâmico caracterizado pela evasão da resposta imune e pela secreção de várias moléculas que modulam o crescimento anormal do tecido e facilitam a invasão e a metástase (BAGAN; SCULLY, 2008; MCALLISTER; WEINBERG, 2010; UDAGAWA; WOOD, 2010).

O conceito de que estímulos estressantes podem influenciar o desenvolvimento e a progressão de tumores malignos não é novo. Galeno, no século dois antes de Cristo, relatou como sendo mais comum o aparecimento de tumores malignos de mama em mulheres por ele categorizadas como “melancólicas” (THAKER; LUTGENDORF; SOOD, 2007; ONDICOVA; MRAVEC, 2010). Estas observações foram corroboradas por pesquisas de caráter epidemiológico mostrando que pacientes com níveis de estresse considerados como elevados apresentavam um maior risco de desenvolver carcinomas, quando comparados aqueles com níveis baixos de estresse (LILLBERG et al., 2003; METCALFE et al., 2007).

Nas últimas décadas, algumas investigações procuraram analisar as vias de sinalização pelas quais o estresse pode modular o desenvolvimento e a progressão tumoral (HASEGAWA; SAIKI, 2002; THAKER et al., 2006; FLINT et al., 2007), sendo este fator, atualmente, considerado como um dos responsáveis pelas diferenças na evolução clínica de pacientes com câncer, que compartilham os mesmos fatores de risco e a mesmo tipo de tratamento (COSTANZO; SOOD; LUTGENDORF, 2011).

Os cientistas têm focado amplamente seus esforços em avaliar como as substâncias produzidas em decorrência do estresse afetam o sistema imune no reconhecimento e eliminação das células tumorais malignas. Pesquisas demonstraram que quantidades elevadas de catecolaminas inibem a produção de

citocinas por parte dos linfócitos T e macrófagos, induzindo desta forma a distúrbios na imunidade celular. Além disso, a administração de bloqueadores β adrenérgicos, durante os períodos peri e pós-cirúrgicos, promovem a imunocompetência e reduzem o risco de metástase (UOTILA, 1996; SAUL et al., 2005; BENISH et al., 2008; GLASNER et al., 2010).

Entretanto, outros aspectos da relação entre o estresse e a gênese e/ou evolução dos tumores malignos têm sido avaliados em diferentes linhagens celulares, assim como em modelos animais. (PALM et al., 2006; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; FLINT et al., 2007; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009; PARK et al., 2010).

Flint et al. (2007) concluíram que o cortisol e as catecolaminas induzem dano no DNA, contribuindo desta maneira para a transformação maligna das células. Adicionalmente, a ação da epinefrina sobre os receptores β adrenérgicos foi correlacionada positivamente com a proliferação de células neoplásicas malignas de esôfago (LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b) e de pâncreas (ZHANG et al., 2009), sendo este efeito bloqueado pelo uso de antagonistas dos receptores β adrenérgicos.

O estresse tem sido também associado com a metástase tumoral, principalmente pela ativação dos receptores β adrenérgicos, sendo significativamente relacionado com a produção elevada de fatores pró-angiogênicos (YANG et al., 2006; YANG et al., 2009; PARK et al., 2010), com o aumento da densidade vascular em modelos animais de carcinoma de ovário (THAKER et al., 2006) e com a maior incidência de metástases linfonodais em modelos animais de câncer de próstata (PALM et al., 2006).

Em carcinomas espinocelulares de boca, poucos estudos avaliaram a importância do estresse e dos receptores adrenérgicos no desenvolvimento e progressão tumoral. Em 2009, Bernabé (2009) investigou o efeito dos hormônios relacionados ao estresse (norepinefrina e cortisol) em culturas celulares de carcinomas espinocelulares de boca. O autor demonstrou a presença de RNAm para os receptores β adrenérgicos nas células malignas e um aumento *in vitro* da proliferação celular induzida pela norepinefrina. Também, por meio de hibridização *in situ*, o autor observou que a expressão do RNAm para o receptor β_1 adrenérgico, nas amostras de carcinoma espinocelular, foi maior que nas amostras de mucosa

normal e de leucoplasia. Sugeriu, com base nestes resultados, que os hormônios do estresse podem atuar diretamente nas células malignas do carcinoma espinocelular de boca afetando a progressão tumoral.

Em outro estudo, Shang, Liu e Liang (2009) também demonstraram um aumento significativo da proliferação celular estimulado por norepinefrina, em cultura de carcinoma espinocelular de boca cujas células expressavam o receptor $\beta 2$ adrenérgico. Além disso, verificaram que, a imunomarcacão citoplasmática e membranosa para o receptor $\beta 2$ adrenérgico em células malignas de CEC humanos foi significativamente correlacionada com a metástase linfonodal, a idade do paciente, o tamanho e o estágio clínico do tumor. Os autores concluíram que a forte expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico parece ter um papel importante no desenvolvimento e metástase do carcinoma espinocelular de boca.

Intrigantemente, poucas análises foram feitas sobre a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico em amostras de carcinomas humanos (PALM et al., 2006; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009) e, apenas o estudo de Yu et al. (2007) correlacionou a expressão desta proteína pelas células malignas com a sobrevida dos pacientes com câncer de próstata.

Portanto, a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico em células neoplásicas e sua relação com a evolução clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, poderá contribuir para o uso desta molécula como alvo de novas estratégias farmacológicas antineoplásicas.

2 – Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resposta do sistema nervoso frente ao estresse

O estresse é definido como um conjunto de reações orgânicas e psíquicas de adaptação que o organismo emite quando é exposto a qualquer estímulo que o excite, irrite, amedronte ou o faça muito feliz (SELYE; HORAVA, 1953). Em uma situação de estresse, o organismo ativa o sistema hormonal hipófise-hipotálamo-glândula supra-renal (GOLDSTEIN, 2010).

O processo de estresse tem início com os receptores que, espalhados por todo o corpo, captam as alterações no ambiente. Os sinais captados chegam até o tálamo cerebral, ativando o sistema límbico incluindo o hipotálamo, o hipocampo, a amígdala e outras áreas adjacentes. Em resposta aos sinais neurosensoriais, o hipotálamo secreta um hormônio denominado CRF (Fator Liberador de Corticotrofina) e também a AVP (Arginina Vasopressina), ambos dos quais estimulam a glândula pituitária (ou hipófise) a liberar a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005; ANTONI et al., 2006).

O principal destino do ACTH são as glândulas supra-renais que passam a distribuir diversas substâncias químicas (glicocorticóides e mineralocorticóides) com o objetivo de estimular o organismo para "luta ou fuga", desencadeando assim, os sintomas referentes ao estresse (GOLDSTEIN, 2010).

A principal resposta do sistema nervoso autônomo ao estresse é mediada, primariamente, pela ativação do sistema nervoso simpático e subsequente liberação de catecolaminas (principalmente norepinefrina e epinefrina), originadas dos neurônios simpáticos e da medula adrenal (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005; ANTONI et al., 2006).

O sistema nervoso simpático é originado do tronco encefálico e os neurônios pré-ganglionares terminam no gânglio próximo da medula espinal. A partir desse gânglio, fibras pós-ganglionares partem até os órgãos efetores. O principal

neurotransmissor das fibras simpáticas pré-ganglionares é a acetilcolina e, o neurotransmissor típico liberado pelos neurônios pós-ganglionares é a norepinefrina (também denominada noradrenalina) (KVETNANSKY; SABBAN; PALKOVITS, 2009).

A ativação desses dois mecanismos é considerada adaptativa e de tempo limitado, tendo como finalidade preparar o indivíduo para enfrentar e sobreviver a uma ameaça. Porém, em situações de estresse crônico, a atividade de órgãos e sistemas (cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, renal, endócrino, e outros) é alterada, sendo este efeito mediado pela prolongada ação do cortisol e das catecolaminas (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

Estudos recentes têm comprovado que o estresse crônico pode influenciar o desenvolvimento e a progressão de tumores malignos, inclusive sendo considerado como um fator de risco para o câncer (HASEGAWA; SAIKI, 2002; PALERMO-NETO; MASSOCO; DE SOUZA, 2003; ANTONI et al., 2006; METCALFE et al., 2007; FITZGERALD, 2009; BERNABÉ, 2009).

2.2 Estresse e câncer

Evidências demonstraram que fatores psicossociais estão ligados aos diferentes aspectos envolvidos na iniciação e progressão de tumores malignos (THAKER; SOOD, 2008). Estes eventos resultam da interação entre as respostas neuroendócrina e autônoma ao estresse com o microambiente tumoral (Figura 1).

Considerando que a qualidade da resposta imune é crítica no desenvolvimento tumoral (YAQUB; AANDAHL, 2009; PAWELEC; DERHOVANESEAN; LARBI, 2010), alguns estudos analisaram as vias pela qual o estresse modula a progressão de tumores malignos, baseadas na supressão da resposta imune. Estudos pré-clínicos demonstraram que o cortisol inibe o sistema imune induzindo principalmente a atrofia do timo, apoptose de linfócitos, redução da produção de citocinas e a alteração da capacidade de reconhecer antígenos microbianos, assim como, de eliminar células tumorais por parte dos linfócitos T e das células *Natural Killer* (NK) (DISTELHORST, 2002; HASEGAWA; SAIKI, 2002; GIDRON; RONSON, 2008; SEPHTON et al., 2009).

FIGURA 1- Vias de sinalização das respostas neuroendócrina e autônoma ao estresse e seus principais efeitos no microambiente tumoral. (Adaptado de ANTONI et al., 2006).

Foi observado também, que as catecolaminas ao atuar nos receptores $\beta 2$ adrenérgicos localizados na membrana de linfócitos T e macrófagos, induzem a distúrbios da imunidade celular, devido principalmente a uma inibição da produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α ; além disso, a administração de bloqueadores β adrenérgicos durante os períodos peri e pós-cirúrgicos promove a imunocompetência e reduz o risco de metástase (UOTILA, 1996; SAUL et al., 2005; BENISH et al., 2008; GLASNER et al., 2010).

Entretanto, tem sido sugerido (THAKER; SOOD, 2008) que a relação entre o estresse e o sistema imune não é suficiente para explicar todos os efeitos pelo qual este fator induz a progressão de um tumor maligno. Outros estudos demonstraram que os mediadores químicos como as catecolaminas e o cortisol regulam diretamente o crescimento e o potencial metastático das células neoplásicas, independentemente de seus efeitos sobre o sistema imune (THAKER; SOOD, 2008; COSTANZO; SOOD; LUTGENDORF, 2011).

A literatura reporta achados heterogêneos referente aos efeitos do estresse e seus mediadores sobre a proliferação de células neoplásicas, principalmente em relação ao tipo de linhagem celular e a via de sinalização molecular analisado. Por exemplo, enquanto alguns autores demonstraram um aumento na proliferação de células malignas de esôfago (LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b) e pâncreas (ZHANG et al., 2009) após a ligação de catecolaminas aos receptores adrenérgicos localizados na membrana celular, outros (CARIE; SEBTI, 2007) observaram a inibição do crescimento celular de linhagens de carcinoma de mama com consequente regressão dos tumores malignos causada pela ação dos agonistas farmacológicos dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos.

Um evento de importância crítica no crescimento e metástase de tumores malignos é a formação de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1990). Linhagens celulares malignas cultivadas com norepinefrina apresentaram uma produção elevada de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a interleucina 6 (IL-6) (YANG et al., 2006; YANG et al., 2009; PARK et al., 2010), sendo esses efeitos inibidos pela ação de bloqueadores dos receptores β adrenérgicos (YANG et al., 2006; YANG et al., 2009; PARK et al., 2010). Similarmente, foi demonstrado que o estímulo dos receptores β adrenérgicos induziu um aumento significativo dos níveis de VEGF e da densidade vascular em tumores malignos de animais submetidos ao estresse (THAKER et al., 2006).

As catecolaminas, via receptores β adrenérgicos são capazes de orquestrar, *in vitro* (YANG et al., 2006), o potencial migratório e invasivo das células malignas, devido principalmente a um aumento da produção de moléculas envolvidas na invasão da matriz extracelular como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Corroborando com estes achados, Palm et al. (2006) observaram que a norepinefrina produz um aumento da incidência de metástases linfonodais de tumores malignos de próstata, previamente transplantados em ratos, efeito este, inibido pelos bloqueadores dos receptores β adrenérgicos.

Como pode ser observado, os mediadores químicos do estresse atuam por meio da ativação de receptores específicos localizados nas membranas celulares (KVETNANSKY; SABBAN; PALKOVITS, 2009). Algumas investigações tem procurado analisar a importância da ativação dos receptores β_2 adrenérgicos na fisiologia das células malignas, visando estabelecer novas estratégias terapêuticas contra o câncer (ASKARI; TSAO; SCHULLER, 2005; THAKER et al., 2006; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; AL-WADEI, H; AL-WADEI, M; SCHULLER, 2009; PARK et al., 2010).

2.3 Receptor β_2 adrenérgico

As proteínas que se encarregam de mediar à ação das catecolaminas são conhecidas como receptores adrenérgicos, sendo nove diferentes moléculas, que devido a sua afinidade por diferentes agonistas farmacológicos, categorizadas em três grupos principais: os receptores α_1 (α_1A , α_1B , α_1D) , α_2 (α_2A , α_2B e α_2C) e β (β_1 , β_2 e β_3) (GUIMARAES; MOURA, 2001).

Particularmente, em relação aos receptores do tipo β , está bem estabelecido que o receptor β_1 se localiza primordialmente na musculatura cardíaca, sendo seu estímulo responsável pelo incremento da força contrátil do coração (BRODDE; BRUCK; LEINEWEBER, 2006).

O receptor β_3 adrenérgico desempenha funções essenciais para a manutenção do equilíbrio do organismo, sendo envolvido com a lipólise e a termogênese (COMAN et al., 2009).

Dentre os receptores adrenérgicos β , o receptor β_2 é o mais amplamente distribuído nos tecidos, localizando-se na musculatura lisa dos vasos sanguíneos,

útero e vias respiratórias, no músculo estriado esquelético, nos linfócitos T e em macrófagos (KOHM; SANDERS, 2001; JOHNSON, 2006). Interessantemente, este receptor adrenérgico é o mais expresso nos queratinócitos da pele humana e da mucosa bucal (BERNABÉ et al., 2009; SIVAMANI et al., 2009; STEENHUIS et al., 2011). A ativação deste receptor $\beta 2$ adrenérgico estimula o relaxamento da musculatura lisa, a contração do músculo estriado esquelético, a diminuição da produção de citocinas e a diferenciação dos queratinócitos (KOHM; SANDERS, 2001; JOHNSON, 2006; PULLAR et al., 2006; SIVAMANI; LAM; ISSEROFF, 2007).

Também em glândulas salivares de coelhos foi demonstrado, pela imunofluorescência, a presença do receptor $\beta 2$ adrenérgico na membrana das células ductais (LI et al., 2006).

Cada receptor $\beta 2$ adrenérgico é uma proteína de aproximadamente 46.500Da constituída por 413 aminoácidos codificada pelo gene ADRB2 (gene do receptor beta 2 adrenérgico), localizado no braço longo do cromossomo 5 (JOHNSON, 2006). Este receptor encontra-se acoplado à proteína G heterotrimérica. A via clássica de sua ativação resulta na dissociação citoplasmática da proteína G, cuja subunidade $G_{\alpha s}$ estimula à adenilciclase a produzir AMP cíclico (cAMP) que ativa a via da proteína quinase A (PKA). Por sua vez a PKA fosforila diversos fatores de transcrição, por exemplo, o CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP) envolvido na proliferação celular e o HIF-1 α (fator 1 α induzível por hipóxia) envolvido na angiogênese. Além disso, a PKA também induz a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática permitindo uma maior entrada deste íon para o interior da célula (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997; SCHULLER; CEKANOVA, 2005; ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009; PARK et al., 2010). Alguns estudos sugeriram que a entrada de cálcio, mediada pelo receptor $\beta 2$ adrenérgico, pode inibir a proliferação dos queratinócitos enquanto aumenta sua diferenciação fenotípica (SIVAMANI; LAM; ISSEROFF, 2007).

A Figura 2 ilustra uma das principais via de sinalização celular após a ativação do receptor $\beta 2$ adrenérgico.

FIGURA 2 - Representação esquemática da ativação do receptor β2 adrenérgico. A ativação do receptor β2 adrenérgico resulta na dissociação citoplasmática da subunidade Gαs da proteína G, que estimula a adenilciclase a clivar o ATP (trifosfato de adenosina) gerando o cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). O cAMP ativa a PKA (proteína quinase A) que fosforila diversos fatores de transcrição como o CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP) e o HIF-1α (fator 1α induzível por hipóxia). Além disso, a PKA pode induzir a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática. (Adaptado de ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009).

2.4 Expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico em células malignas

Muitas investigações demonstraram que a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico em tumores malignos sólidos exerce um papel importante na regulação do crescimento, migração, proliferação e apoptose das células malignas (MASUR et al., 2001; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; CARIE; SEBTI, 2007; YU et al., 2007; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009).

Em 2001, Masur et al. (2001) investigaram se as catecolaminas eram capazes de regular a migração das células do carcinoma de cólon. A expressão dos receptores adrenérgicos foi analisada por citometria de fluxo, e para determinar a locomoção celular, foi usada a técnica da videomicroscopia. Os receptores β adrenérgicos foram fortemente expressos nas células malignas. O tratamento com norepinefrina aumentou a atividade de locomoção das células malignas em 65% e, quando adicionado o propranolol, um bloqueador dos receptores β adrenérgicos, houve redução significativa da mobilidade celular. Em contraste, a adição do bloqueador específico do receptor $\beta 1$ adrenérgico, atenolol, não inibiu o efeito da norepinefrina sobre a mobilidade celular. Os autores concluíram que a norepinefrina estimulou a migração das células do carcinoma de cólon, via estímulo do receptor $\beta 2$ adrenérgico, e sugeriram que o uso de fármacos bloqueadores do receptor $\beta 2$ adrenérgico poderia ser útil na prevenção da invasão e metástases destas células.

Posteriormente, Thaker et al. (2006) correlacionaram o estresse, em modelos animais de carcinoma de ovário, com o crescimento e a metástase tumoral. Linhagens de células de carcinoma de ovário foram transplantadas para cavidade peritoneal de ratos, submetidos ao estresse físico e psicológico. Os animais foram sacrificados aos 21 dias após os transplantes, sendo os tumores avaliados por meio da técnica imuno-histoquímica para os anticorpos anti-CD31 e anti-VEGF. Os resultados mostraram que, os tumores em animais estressados apresentaram um incremento da vascularização, da expressão de VEGF, MMP-2, MMP-9 e dos níveis de RNAm para VEGF. Em relação ao peso dos tumores e o número de linfonodos comprometidos houve um aumento proporcional ao número de horas de aplicação de estresse nos animais. Também foram aplicados silenciadores de RNA específicos para cada um dos receptores β adrenérgicos nas células tumorais, antes de serem transplantadas. Os resultados demonstraram que, em animais com tumores

constituídos por células com bloqueio da expressão do receptor $\beta 1$ adrenérgico o estresse continuou estimulando o aumento de peso e a metástase tumoral, o que não ocorreu nos tumores com silenciamento da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Os autores concluíram que a ativação dos receptores β adrenérgicos, provavelmente, constituiu um dos principais mecanismos pelo qual o estresse aumentou a angiogênese *in vivo* e, conseqüentemente, estimulou o crescimento das células malignas. Sugeriram ainda que, o bloqueio do receptor $\beta 2$ adrenérgico pode ser útil no manejo de pacientes com câncer de ovário.

Também em 2006, Yang et al. (2006) investigaram se o hormônio norepinefrina poderia influenciar a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) e de VEGF em linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo. Os efeitos da norepinefrina na síntese de MMP-2, MMP-9 e VEGF foram determinados por ELISA. A atividade funcional das metaloproteinases foi obtida pelo potencial de invasão celular usando um sistema de invasão de membrana em cultura e, a atividade funcional de VEGF, analisada utilizando um ensaio de formação de tubo por células endoteliais de veia umbilical humana. O tratamento com norepinefrina aumentou os níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF no sobrenadante da cultura de carcinoma nasofaríngeo, sendo bloqueado pelo propranolol. Observou-se também que, o hormônio norepinefrina induziu a invasão de todas as linhagens celulares de forma dose dependente e estimulou a liberação de fator angiogênico funcional, o VEGF, por células malignas. Os receptores β adrenérgicos foram identificados nas sete biopsias de carcinoma nasofaríngeo humanos examinadas pela imuno-histoquímica, e, em todos os tumores houve grande número de células epiteliais com expressão membranosa do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Para os autores estes resultados sugeriram que o hormônio norepinefrina, via receptor $\beta 2$ adrenérgico, afeta a progressão do carcinoma nasofaríngeo, em parte, por meio da modulação das citocinas angiogênicas.

Interessantemente, Carie e Sebi (2007) ao investigar as possíveis utilidades dos agonistas farmacológicos dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos, observaram que estas substâncias inibiram o crescimento celular, induziram a apoptose das linhagens celulares de carcinoma de mama e, em consequência, causaram regressão tumoral, sendo estes efeitos mediados pelo incremento do cAMP que suprimiu as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2). Contrariamente, não foram obtidos os mesmos resultados quando testadas outras linhagens

celulares, levando os autores a considerar que a regressão tumoral foi limitada aquelas neoplasias que expressaram receptores $\beta 2$ adrenérgicos e nas quais a ativação desses receptores bloqueou a via de sinalização da ERK 1/2.

No mesmo ano, Yu et al. (2007) analisaram o possível papel pró-oncogênico da proteína realçadora do Zeste 2 (EZH 2), proteína esta capaz de suprimir a transcrição genética, em linhagens de carcinoma de próstata. Para identificar quais os possíveis genes alvos da supressão, os autores realizaram diferentes testes com as células de carcinoma de próstata. Um dos grupos de células malignas foi infectado por adenovírus carregando EZH 2 e, no outro grupo, aplicaram silenciadores genéticos da EZH 2. As células com aumento de expressão de EZH 2 demonstraram uma redução significativa nos níveis de RNAm e proteicos do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Consistente com estes resultados, as células com silenciamento genético da EZH 2 apresentaram níveis aumentados de RNAm e proteicos do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Com bases nesses resultados, os autores decidiram analisar qual o papel da expressão diminuída do receptor $\beta 2$ adrenérgico em células normais de próstata. Verificaram que as células com silenciamento genético do receptor $\beta 2$ adrenérgico ou com o bloqueio farmacológico deste receptor, apresentaram um incremento da capacidade migratória e invasiva. Estes resultados sugeriram que, a inibição do receptor $\beta 2$ adrenérgico induziu um fenótipo oncogênico nas células benignas de próstata. Similarmente, as linhagens celulares de câncer de próstata com silenciamento genético da EZH 2 ou com aplicação do agonista adrenérgico isoproterenol, tiveram uma redução significativa da capacidade invasiva, quando comparada ao grupo controle. Posteriormente, foi avaliada a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico em 36 amostras de tecido prostático normal, 6 de neoplasia intra-epitelial de próstata, 82 de carcinoma de próstata localizado e 16 de carcinomas de próstata metastáticos. Houve diferenças estatisticamente significativas na expressão imuno-histoquímica do receptor, sendo que os tumores metastáticos tiveram os níveis mais fracos de expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Analisaram ainda, a sobrevida livre de doença dos 82 pacientes com carcinomas localizados de próstata, pelo Kaplan Meier, e os resultados revelaram que os escores baixos de expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico foram associados, significativamente ($p = 0,002$), a recidiva tumoral, quando comparados aos altos escores de expressão desta proteína. Adicionalmente, o modelo de regressão de Cox indicou o receptor $\beta 2$ adrenérgico como um fator independente de prognóstico

para o câncer de próstata. A probabilidade de recidiva tumoral em pacientes com leve expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas células malignas foi 3,4 vezes superior, se comparado àqueles com forte expressão desta proteína. Os autores sugeriram então, que a identificação do receptor $\beta 2$ adrenérgico como um alvo da ação da EZH 2 poderia ser utilizado como um biomarcador de prognóstico do câncer de próstata.

O papel da sinalização dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos na regulação do crescimento de linhagens celulares de carcinomas espinocelulares do esôfago, foi investigada por Liu et al. (2008b), Para quantificar a proliferação celular, os pesquisadores empregaram a análise de incorporação de $[3H]$ -timidina. Para determinar a expressão dos receptores β adrenérgicos, COX-2, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 utilizaram RT-PCR e *Western blot*. As células malignas expressaram RNAm para receptores β adrenérgicos, tanto $\beta 1$ como $\beta 2$. A estimulação dos receptores β adrenérgicos com epinefrina aumentou significativamente a proliferação das células malignas, acompanhados pela elevação dos níveis de cAMP intracelulares, os quais foram bloqueados pelos antagonistas seletivos de $\beta 1$ ou $\beta 2$. Os autores investigaram também o envolvimento da epinefrina na via ERK 1/2 e da COX-2. Os resultados mostraram que a epinefrina aumentou a fosforilação do sinal regulador da ERK 1/2, da COX-2 e a expressão no citoplasma da fosfolipase A2, os quais foram bloqueados pelos antagonistas seletivos de $\beta 1$ ou $\beta 2$. De maneira interessante, encontraram também aumento da expressão de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, os quais foram inibidos pelo bloqueio dos receptores β adrenérgicos, principalmente do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Os autores demonstraram que as células malignas do carcinoma espinocelular de esôfago expressaram receptores β adrenérgicos e concluíram que, a estimulação destes receptores pela epinefrina promoveu a proliferação celular ativando a via cAMP–ERK1/2–COX-2. Sugeriram então, que este conhecimento oferecia novas possibilidades terapêuticas, baseadas no uso de bloqueadores dos receptores β adrenérgicos, na prevenção e tratamento do carcinoma espinocelular de esôfago.

Ainda em 2008, Liu et al. (2008a) realizaram outros experimentos visando esclarecer se existia uma conexão entre o aumento da expressão de fator de crescimento epidérmico (EGF) e de seu receptor (EGFR) com os receptores β adrenérgicos na progressão da linhagem celular de carcinoma de esôfago. O EGF foi usado para estimular as células malignas e a atividade dos receptores

adrenérgicos foi monitorada pelos níveis intracelulares de cAMP na ausência ou presença de antagonistas dos receptores β adrenérgicos. Os resultados demonstraram que o EGF aumentou, significativamente, os níveis de cAMP e a proliferação celular, ambos dos quais foram diminuídos pelos antagonistas dos receptores adrenérgicos. O EGF estimulou também a transcrição de RNAm da tirosina hidroxilase e a formação da enzima tirosina hidroxilase, o que finalmente levou a uma maior produção de epinefrina. Concluíram que a epinefrina pode ser produzida de forma autócrina em resposta à estimulação do EGFR, o que levaria à transativação dos receptores β adrenérgicos. Este estudo demonstrou que a sinalização adrenérgica poderia ser aumentada em múltiplos níveis de ativação de EGFR, mediando assim, a sinalização mitogênica das células do câncer de esôfago.

Outros aspectos como a capacidade da norepinefrina de modular a expressão de interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6) e VEGF em linhagens celulares de melanomas foram investigados por Yang et al. (2009). O efeito da norepinefrina nos níveis de IL-8, IL-6 e VEGF foram determinados por ELISA e RT-PCR nas linhagens celulares, e a expressão dos receptores β adrenérgicos em biopsias de melanomas humanos. Cortes microscópicos obtidos de 20 melanomas (10 lesões primárias e 10 metastáticas) foram submetidos à técnica imuno-histoquímica para detecção dos anticorpos: anti-receptor β_1 adrenérgico e anti-receptor β_2 adrenérgico. O tratamento com norepinefrina aumentou a produção de IL-8, IL-6 e VEGF bem como, os níveis de RNAm destas moléculas. A microscopia revelou que 9 das 10 biopsias de tumores primários e/ou metastáticos apresentavam expressão citoplasmática e membranosa forte do receptor β_2 adrenérgico. Em relação ao receptor β_1 adrenérgico, 6 lesões primárias e 8 metastáticas foram positivas para este receptor. Para os autores estes resultados fortaleceram a hipótese de que a norepinefrina pode estimular o potencial agressivo dos melanomas, em parte por indução da produção de IL-8, IL-6 e VEGF. Sugeriram ainda, que o uso de bloqueadores dos receptores β_2 adrenérgicos poderia representar novas estratégias terapêuticas contra a progressão destes tumores malignos.

Embora a presença de receptores β adrenérgicos funcionais na superfície de células escamosas tenha sido identificada desde 1971 por Powell, Duelle e Voorhees (1971 apud SIVAMANI; LAM; ISSEROFF, 2007), particularmente no carcinoma espinocelular de boca, poucos estudos investigaram a expressão desses e proliferação celular ou metástases (BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009).

Um interessante trabalho de Bernabé (2009), avaliou os efeitos da norepinefrina sobre a expressão de IL-6 e a proliferação celular, em linhagens celulares de carcinomas espinocelulares de boca (SCC-9 e SCC-25). O autor utilizou RT-PCR e ELISA para avaliar a expressão de IL-6 e a expressão de RNAm para os receptores β adrenérgicos nas células malignas. Além disso, o autor comparou, *in vivo*, a expressão dos receptores β adrenérgicos entre 20 carcinomas espinocelulares, 17 leucoplasias bucais e 15 amostras de mucosa bucal normais. Os resultados revelaram que, em ambas as linhagens tumorais, a norepinefrina aumentou a expressão de IL-6 bem como do RNAm desta proteína. A proliferação das células SCC-9 foram aumentadas após o estímulo com norepinefrina, o que foi inibido pelo antagonista propranolol. Ambas as linhagens de carcinomas expressaram RNAm para receptor β_1 adrenérgico e receptor β_2 adrenérgico. O autor demonstrou também um perfil distinto de expressão dos receptores β adrenérgicos em biopsias humanas de carcinomas espinocelulares de boca, leucoplasia bucal e mucosa bucal normal. A expressão do RNAm para o receptor β_1 adrenérgico nas amostras de carcinoma espinocelular foi 2,7 vezes e 1,6 vezes maior que nas amostras de mucosa normal e de leucoplasia, respectivamente. Contrariamente, a expressão do RNAm para o receptor β_2 adrenérgico foi menor na leucoplasia do que na mucosa normal e nos carcinomas espinocelulares. O autor concluiu que a norepinefrina, atuando por meio dos receptores β adrenérgicos, aumentou diretamente a produção da IL-6 e, desta maneira, induziu a proliferação das células do carcinoma espinocelular de boca.

Outro estudo em boca de Shang, Liu e Liang (2009), examinaram a correlação entre o receptor β_2 adrenérgico e a metástase do carcinoma espinocelular de boca. Foram empregados RT-PCR e *Western blot* para determinação dos níveis de expressão do receptor β_2 adrenérgico em uma linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua. Após o emprego de norepinefrina, foi analisada a quimiotaxia e a proliferação celular. A técnica imuno-histoquímica foi utilizada para investigar a expressão do receptor β_2 adrenérgico em 65 carcinomas espinocelulares de boca obtidos de pacientes sem tratamento prévio (28 pacientes com estadio clínico I/II, 37 com estadio III/IV) e destes, 31 apresentavam metástase linfonodal. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-receptor β_2 adrenérgico humano sendo considerados positivos os carcinomas com mais de 30% de células malignas imunomarcadas para o receptor. Os resultados demonstraram

que as células malignas cultivadas, *in vitro*, expressaram o receptor $\beta 2$ adrenérgico bem como, o RNAm para este receptor. Estas células foram capazes de atravessar barreiras membranosas sintéticas, por meio do efeito quimiotático da norepinefrina. Os ensaios de proliferação celular indicaram que a norepinefrina estimulou a mitose das células malignas, efeito este completamente inibido pelo propranolol. Finalmente a avaliação imuno-histoquímica evidenciou que as células tumorais tiveram marcação citoplasmática e membranosa positiva para o receptor $\beta 2$ adrenérgico. Um total de 67,7% dos carcinomas espinocelulares de boca foi positivo para a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico, sendo esta imunomarcação, significativamente, correlacionada com a metástase linfonodal, a idade, o tamanho e o estadio clínico do tumor. Estes resultados permitiram concluir que, a expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico pode mediar o desenvolvimento da metástase do carcinoma espinocelular de boca.

A presente revisão de literatura confirma que, o significado clínico da expressão de receptores beta-adrenérgico por células malignas em carcinoma espinocelular de boca tem sido pouco investigado, o que justifica o presente estudo e sua possível contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias antitumorais, baseadas no uso de bloqueadores de receptores adrenérgicos.

3 – *Proposição*

3 PROPOSIÇÃO

1. A partir da análise de 106 carcinomas espinocelulares de boca, com estadiamento clínico II, III e IV propôs-se verificar:
 - a expressão imuno-histoquímica do receptor beta 2 adrenérgico pelas células malignas nas regiões do *front* de invasão tumoral;
 - a associação da expressão tumoral deste receptor com as características clínicas, evolução e o prognóstico dos pacientes.
2. Contribuir com o significado clínico da expressão de receptores beta 2 adrenérgicos em células malignas e com a identificação de fatores de prognóstico em pacientes com carcinomas espinocelulares de boca.

4 – Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo foi constituída por 106 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca (CEC), submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital de Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2000. Esta amostra de CEC foi previamente estudada por Dorta et al. (2002) e Sampaio-Góes et al. (2005) sendo utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes com carcinoma espinocelular de boca localizado na língua, assoalho bucal, gengiva inferior e área retromolar, confirmados por biopsia;
- pacientes submetidos à cirurgia como tratamento inicial, com ou sem radioterapia pós-operatória;
- tumores com estadiamento clínico II, III e IV;
- ausência de outros tumores primários simultâneos;
- seguimento clínico completo;
- fragmento de tumor suficiente para análise microscópica;
- disponibilidade dos blocos de parafina dos respectivos tumores, bem como a adequada conservação dos espécimes;

Os critérios de exclusão foram:

- contra-indicação cirúrgica (pacientes considerados inoperáveis);
- presença de metástase à distância no momento da admissão no hospital;
- pacientes que recusaram o tratamento.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas referentes aos pacientes e a peça cirúrgica foram obtidas a partir do banco de dados pertencentes ao Hospital do Câncer A.C. Camargo. Estes registros incluíram a identificação e os dados demográficos dos pacientes, informações relativas à história clínica, ao exame loco regional, cirurgia, radioterapia pós-operatória, microscopia da peça cirúrgica inicial e evolução do paciente (ocorrência ou não de recidiva local e regional, de metástase à distância e de segundo tumor primário) como descrito no formulário proposto para coleta de dados (Figura 4). No caso de pacientes vivos a evolução clínica foi atualizada até o ano de 2009 por meio de consulta aos respectivos prontuários arquivados no SAME (Serviço de Arquivo Médico) do referido hospital.

4.3 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis consideradas neste estudo referem-se aos dados demográficos relativos aos pacientes como a idade, o gênero (masculino ou feminino) e a raça (branca ou não branca).

Quanto à história clínica dos pacientes, pesquisou-se o tabagismo (não fumante ou fumante) e o etilismo (não etilista ou etilista).

No exame locorregional, a localização do tumor primário foi registrada como: 1-língua; 2-assoalho de boca; 3-gengiva inferior ou 4-área retromolar. As lesões foram descritas quanto a extensão do tumor para outros sítios anatômicos (0-sem extensão para outro sítio anatômico, 1-uma área, 2-duas áreas, 3-três áreas ou 4-quatro áreas) e o tipo de lesão (1-úlcero-vegetante, 2-úlcero-infiltrativa ou 3-outra).

A classificação clínica adotada pelo Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo segue o sistema TNM/UICC (SOBIN; WITTEKIND, 2002) e, portanto, os pacientes do estudo foram classificados pelos estádios clínicos T (1- T1; 2- T2; 3- T3 ou 4- T4) e N (0- N0 ou 1- N+).

Quanto ao tratamento, registrou-se a data da cirurgia, a realização ou não de esvaziamento cervical (ipilateral ou ipilateral e contralateral simultâneos), bem como os dados referentes à radioterapia pós-operatória, se foi realizada ou não.

Para análise microscópica da peça cirúrgica, utilizou-se um corte representativo de cada espécime tumoral, os quais foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) adotando-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica de Hospital de Câncer A. C. Camargo.

A queratinização, o pleomorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e o infiltrado inflamatório foram graduados de 1 a 4 de acordo com o índice de graduação da malignidade proposto por Bryne et al.(1989) descrito na Tabela 1.

A embolização vascular e as infiltrações perineural, muscular e óssea foram classificadas como ausentes ou presentes.

As informações sobre o comprometimento linfonodal cervical histopatológico (pN) (0-negativo; 1-positivo; 9-sem esvaziamento cervical), foram obtidas do laudo anatomopatológico da peça cirúrgica inicial.

Quanto à evolução dos pacientes, registrou-se a ocorrência ou não de recidivas local e regional, de metástase à distância e de segundo tumor primário.

Registraram-se também a data da primeira recidiva, os locais da recidiva (0-não teve; 1-local; 2-pescoço ipsilateral; 3-pescoço contralateral; 4-pulmão; 5-osso; 6-fígado; 7-outra à distância e 8-recidiva em local ignorado), a data do diagnóstico do segundo tumor primário, o local do segundo tumor primário, a data da última informação de seguimento.

Registraram-se a data e a situação do paciente na última informação objetiva de seguimento. Para a variável situação o registro foi feito da seguinte forma: 1-vivo e sem evidência da doença (000); 2-vivo com câncer; 3-morte por intercorrência cirúrgica (MOCI); 4-morte decorrente do tumor primário (MOCA); 5-morte sem evidência de recidiva do tumor primário (MOASS) e 6-perdido de vista. Definiram-se como pacientes perdidos de vista, aqueles com menos de cinco anos de seguimento e que deixaram de retornar por um período igual ao dobro pré-estabelecido. Pacientes assintomáticos que foram perdidos de vista, após cinco anos de seguimento, foram classificados como vivos e livres de doença (000).

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.4.1 Graduação da Malignidade Tumoral

A graduação da malignidade tumoral foi realizada utilizando-se o índice histopatológico de malignidade proposto por Bryne et al.(1989), que analisa as características morfológicas apresentadas pelas células malignas na região do *front* de invasão tumoral, a porção mais invasiva visualizada no corte microscópico analisado.

A área do *front* de invasão tumoral de cada espécime foi percorrida e analisada por dois examinadores (D.M.B.C. e D.T.O.), sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop2 Plus, ZEISS), contendo uma objetiva de 40X.

Cortes microscópicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir das peças cirúrgicas do tumor primário, que estavam arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) e, posteriormente, analisados quanto à graduação da malignidade nas áreas mais invasivas, de acordo com o escore de malignidade proposto por Bryne et al. (1989), apresentado na Tabela 1.

Para cada carcinoma espinocelular de boca o componente individual do sistema de graduação foi analisado e, posteriormente, somado em um escore final de malignidade, que variou de 5 a 20 pontos. Os espécimes tumorais foram então classificados como pouco agressivos (escore final ≤ 12) ou muito agressivos (escore final >12).

TABELA 1 – Graduação de malignidade do *front* de invasão tumoral, de acordo com Bryne et al. (1989).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	ESCORES DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Queratinização	Intensa (>50% das células)	Moderada (20-50% das células)	Baixa (5-20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Discreto (>75% das células maduras)	Moderado (50-75% das células maduras)	Intenso (25-50% das células maduras)	Extremo (0-25% das células maduras)
Número de mitoses	0 a 1	2 a 3	4 a 5	>5
Padrão de invasão	Compressivo e com bordas bem definidas	Cordões sólidos e grossos de células tumorais	Cordões finos de células tumorais	Células tumorais isoladas ou dissociadas em pequenos grupos
Resposta do hospedeiro	Intensa	Moderada	Leve	Ausente

4.4.2 Método Imuno-histoquímico

A marcação imuno-histoquímica dos carcinomas espinocelulares de boca seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, São Paulo – SP, utilizando-se a técnica do polímero de terceira geração, marcado com imunoglobulinas e peroxidase como proposto por Shi et al. (1999), previamente padronizada no plano piloto, para o anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico.

Após desparafinização em xilol e hidratação em álcool seriado, foi realizada a recuperação antigênica por meio da incubação dos espécimes em solução de tampão citrato a 10mM e pH 6,0 usando a panela de pressão (Eterna, NIGRO) durante 4 minutos após a pressurização total.

As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H_2O_2 a 3% (água oxigenada a 10 volumes), com 3 trocas de 10 minutos cada.

Realizado o bloqueio da peroxidase endógena, os espécimes foram incubados com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico (Santa Cruz Biotechnology, sc-9042, Santa Cruz, CA, EUA), no título pré-estabelecido de 1:50, diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) a 10mM e pH 7,4; contendo soro albumina bovino (BSA) a 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) a 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Os espécimes foram novamente incubados com o anticorpo pós-primário *Post Primary Block* (Novo Link Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C e, posteriormente com o *Novo Link Polymer* (Novo Link Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido) por 30 minutos a 37°C.

O produto final da reação foi revelado em substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) a 100mg (Sigma, D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1mL de H_2O_2 a 6% (água oxigenada a 20 volumes); 100mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavados em água corrente e destilada, desidratados em álcool seriado e xilol, e as lâminas montadas com a utilização de resina adesiva *Entellan Neu* (Merck, 1.07961, Alemanha).

Entre cada uma das etapas do protocolo de reações imuno-histoquímicas, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada.

Utilizou-se como controle positivo um corte de carcinoma espinocelular corado previamente durante a padronização da diluição do anticorpo para este tumor e como controle negativo um corte do mesmo tecido com a omissão do anticorpo primário. A imunomarcagem da musculatura lisa dos vasos sanguíneos do estroma dos carcinomas espinocelulares foi utilizada como controle imuno-histoquímico interno.

4.4.3 Avaliação Imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico

A avaliação da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos CECs de boca, foi realizada por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens na região do *front* de invasão tumoral. Um total de dez campos microscópicos para cada tumor (106 CECs) foi adquirido a partir de uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS) contendo uma objetiva de 40X. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS). Cada campo microscópico capturado pelo programa correspondia a uma área de 93.992,05 μm^2 .

Os campos microscópicos tumorais foram obtidos sequencialmente na região do *front* de invasão tumoral, tomando-se o cuidado de capturar a maior área de células epiteliais malignas e de não deixar nenhuma célula repetida por campo.

A avaliação imuno-histoquímica da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas foi automaticamente realizada com base na intensidade da coloração das células epiteliais tumorais em cada campo microscópico capturado dos CECs.

Inicialmente foi realizada uma padronização de algumas imagens representativas dos CECs manualmente segmentadas por meio do programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java* – programa desenvolvido em linguagem Java e de domínio público) obtendo-se, dessa forma, amostras de áreas tumorais imunomarcadas pelo anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico. A partir dessas imagens foram determinadas as variações da intensidade de marrom das células malignas, positivamente coradas, de acordo com os seguintes critérios para os componentes RGB:

- 1) Componente R (*red* = vermelho) – variação de 90 a 194;
- 2) Componente G (*green* = verde) – variação de 50 a 140;
- 3) Componente B (*blue* = azul) – variação de 45 a 147;
- 4) O valor de R deveria ser maior que o de B.
- 5) O valor de G deveria ser maior que o de B.

Em seguida, as 10 imagens, obtidas da região de *front* de invasão tumoral de cada CEC, foram segmentadas automaticamente utilizando-se um programa desenvolvido na linguagem MATLAB de acordo com os critérios descritos acima.

Este programa determinou valores numéricos com base na quantidade de pixels das áreas segmentadas (positivamente imunomarcadas pelo anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico) como ilustrado na Figura 3. Calculou-se então, a média aritmética da intensidade de pixels obtida dos 10 campos microscópicos tumorais avaliados para cada CEC de boca. Na sequência, a média foi colocada em ordem crescente e amostra tumoral dividida e classificada, pela mediana, em dois grupos:

- 1 = imunomarcção negativa (a média variou de 0,35 até 29,94);
- 2 = imunomarcção positiva (a média variou de 30,39 até 80,39).

A imunomarcção positiva ou negativa das células malignas pelo receptor $\beta 2$ adrenérgico foi confirmada, subjetivamente, por dois examinadores sem conhecimento prévio da graduação histopatológica de malignidade e/ou da evolução clínica dos pacientes.

Quando houve discordância entre a análise subjetiva e a análise automática computadorizada da expressão tumoral positiva ou negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico (13% dos tumores), foi mantido o resultado da análise subjetiva obtida percorrendo-se todo o *front* de invasão tumoral dos CEC de boca.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS *for Windows* versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Para a verificação das médias de idade dos pacientes utilizou-se o teste t de Student.

A associação da expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico com as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas foi avaliada pelo teste qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para a análise da sobrevida global utilizou-se o tempo de seguimento, em meses, entre a data da cirurgia do tumor primário e o óbito do paciente, independente da causa da morte, ou a data da última informação objetiva de seguimento.

FIGURA 3 - Determinação automática da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos CEC de boca, com base na quantidade de pixels segmentados como imunopositivos para esta molécula, na região do *front* de invasão tumoral.

A = imagem do carcinoma espinocelular de boca com expressão negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas;

C = imagem do carcinoma espinocelular de boca com forte expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas;

B e D = resultados das segmentações das imagens A e C, respectivamente, obtidas automaticamente (em vermelho) das áreas positivamente imunomarcadas pelo anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico.

O tempo decorrido, em meses, entre a cirurgia do tumor primário e o óbito em decorrência específica deste tumor foi utilizado para a análise da sobrevida específica por câncer. Para os casos censurados considerou-se a data da última informação objetiva de seguimento.

Para as análises das sobrevidas global e específica por câncer foram considerados “não censurados” os pacientes que apresentaram um evento de interesse (óbito para a sobrevida global e óbito pelo tumor primário para a sobrevida específica por câncer). Os casos considerados “censurados” foram aqueles em que até a data da última informação objetiva de seguimento não ocorreu nenhum evento de interesse.

As análises das sobrevidas global e específica por câncer foram feitas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo teste *log-rank*, com o nível de significância igual a 5%.

O modelo de regressão múltiplo de Cox foi utilizado para testar a associação entre idade, comprometimento linfonodal, estadiamento clínico T, receptor $\beta 2$ adrenérgico e as sobrevidas global e específica por câncer, com o nível de significância igual a 5%.

4.6 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS) utilizado para a avaliação imuno-histoquímica.

4.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, em reunião de 13 de abril de 2010, sob o nº 1385/10 (ANEXO 1).

FIGURA 4- Formulário utilizado na coleta dos dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com carcinoma espinocelular de língua, assoalho de boca, gengiva inferior e área retromolar em estádios clínicos II, III e IV.

Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Departamento de Estomatologia - Área de Patologia

Fundação Antônio Prudente / Hospital do Câncer A. C. Camargo

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

Departamento de Anatomia Patológica

“Expressão de receptor beta-2 adrenérgico em carcinoma espinocelular de boca e sua associação com a evolução clínica tumoral”

Diego Mauricio Bravo Calderón; Dra. Denise Tostes Oliveira; Dr Luiz Paulo Kowalski;

Dr Gilles Landman

I. Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____

2. RGH: _____

3. Idade: _____ anos

4. Gênero: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino

5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-não branca

II. História clínica:

6. Tabagismo: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-desc.

7. Etilismo: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-desc.

III. Exame loco-regional:

8. Local do tumor: ☐ 1-língua ☐ 2-assoalho ☐ 3-gengiva inferior ☐ 4- área retromolar

9. Extensão do tumor: ☐ 0-não ☐ 1-uma área ☐ 2-duas áreas

☐ 3- três áreas ☐ 4- quatro áreas

10. Tipo de lesão: ☐ 1-úlcero-vegetante ☐ 2-úlcero-infiltrativa ☐ 3-outra _____

11. Estádio T (UICC 2002): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2 ☐ 3-T3 ☐ 4-T4

12. Estádio N (UICC 2002): ☐ 0-N0 ☐ 1- N+

IV. Cirurgia:

13. Data da cirurgia: ____/____/____

14. Cirurgia : ☐ 1- cirurgia com esvaz. cervicalipsilateral

☐ 2- cirurgia com esvaz. cervicalcontralateral (simult)

V. Radioterapia pós-operatória:

15. ☐ 0-não ☐ 1-sim

VI. Análise microscópica:

16. Número do AP: _____

17. Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ignorado

18. Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ignorado

19. Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ignorado

20. Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ignorado

21. pN: ☐ 0-negativo ☐ 1-positivo ☐ 9-sem esvaziamento cervical

VII. Evolução:

22. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (em branco se não teve)

23. Locais de recidiva: ☐ 0-não teve ☐ 1-local ☐ 2-pescoço ipsi

☐ 3-pescoço contra ☐ 4-pulmão

☐ 5-osso ☐ 6-fígado

☐ 7-outra à distância _____

☐ 8-teve recidiva, local ignorado

24. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (em branco se não teve)

25. Local do segundo tumor primário: _____ (0 se não teve)

26. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____

27. Situação na última informação de seguimento: ☐ 1-vivo 000 ☐ 2-vivo com CA

☐ 3-MOCI ☐ 4-MOCA

☐ 5-MOASS _____

☐ 6-perdido de vista (definição: pacientes

com menos de 5 anos de seguimento e que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como vivo 000).

5 – Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Os carcinomas espinocelulares de boca utilizados neste estudo constituem parte do banco de dados do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia e do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo – SP, Brasil, no período de 1970 a 2000. Após a aplicação dos critérios de inclusão previamente mencionados, selecionou-se um total de 106 pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular primário de língua, de assoalho de boca, de área retromolar e de gengiva inferior em estádios clínicos II, III e IV.

Neste capítulo, inicialmente são apresentadas as distribuições percentuais das características demográficas, clínicas e microscópicas da população estudada. Na sequência, estão descritos as associações entre estas variáveis e a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A maior frequência de carcinoma espinocelular de boca nesta amostra foi detectada em pacientes do gênero masculino (84,9%) e da raça branca (87,7%), como descrito na Tabela 2. A idade mínima observada entre os 106 pacientes foi de 30 anos e a máxima de 81 anos, sendo a média de 58 anos (desvio padrão = 8,38 anos). A maioria dos pacientes apresentava idade igual ou menor a 58 anos (51,9%), (Tabela 2).

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca observou-se que, 84% dos pacientes eram tabagistas e 65,1% eram etilistas; sendo que a maioria dos pacientes (62,2%) apresentou, simultaneamente, ambos os fatores de risco para a neoplasia (Tabela 2).

TABELA 2 - Distribuição de frequência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Nº de pacientes	%
Gênero		
Masculino	90	84,9
Feminino	16	15,1
Raça		
Branca	93	87,7
Não Branca	13	12,3
Idade		
≤ 58 anos	55	51,9
> 58 anos	51	48,1
Tabagismo		
Sim	89	84,0
Não	4	3,7
Desconhecido	13	12,3
Etilismo		
Sim	69	65,1
Não	23	21,7
Desconhecido	14	13,2
Tabagismo + etilismo		
Sim	66	62,2
Não	25	23,6
Desconhecido	15	14,2
TOTAL	106	100,0

Quando analisadas as características clínicas dos tumores, observou-se que o carcinoma espinocelular de boca teve sua localização mais comum na língua (53,8%), seguida pelo assoalho de boca (26,4%), a área retromolar (12,3%) e a gengiva inferior (7,5%), como pode ser observado na Tabela 3.

Clinicamente, os tumores apresentaram-se como lesões úlcero-infiltrativas (64,2%) e em menor proporção como lesões úlcero-vegetantes (34,9%). Na maioria dos pacientes (69,8%), o tumor estendia-se além de seu local de origem (Tabela 3).

Quanto ao estadiamento clínico T, 0,9% dos pacientes apresentaram tumores classificados como T1, 54,7% como T2, 38,7% como T3 e 5,7% como T4, adotando-se os critérios de estadiamento clínico definido pela TNM/UICC (SOBIN; WITTEKIND, 2002) (Tabela 3).

Verificou-se ainda, que a maioria dos pacientes (52,8%) apresentou linfonodos regionais clinicamente palpáveis no momento do exame físico (N+), como descrito na Tabela 3.

Em relação ao estágio clínico (Tabela 3), nesta casuística, a grande maioria dos pacientes (71,7%), no momento do diagnóstico, apresentou estádios clínicos avançados (III-IV). O único paciente com um tumor classificado como T1 apresentou envolvimento linfonodal (N+) sendo, portanto, incluído nos 62,3% dos tumores com estágio clínico III de acordo com os critérios da TNM/UICC (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

De acordo com os critérios de inclusão dos pacientes no estudo, 100% foram submetidos à cirurgia como tratamento inicial do carcinoma espinocelular de boca, sendo que em 83% destes pacientes foi realizado esvaziamento cervical ipsilateral e em 17% o esvaziamento cervical bilateral simultâneo. Cinquenta por cento dos pacientes receberam radioterapia pós-operatória adjuvante (Tabela 4).

A ocorrência de recidiva locorregional e/ou metástase à distância foi relatada em 47 pacientes (44,3%), acometendo mais comumente o próprio local do tumor primário (29,2%), seguida pela recidiva regional (17%), como pode ser observado na Tabela 4. Cinco pacientes apresentaram recidiva local e regional simultaneamente e apenas três pacientes (2,8%) apresentaram comprometimento metastático à distância (Tabela 4), sendo dois no pulmão e outro em local desconhecido.

Constatou-se a ocorrência de um segundo tumor primário em dezessete pacientes (16%) com carcinoma espinocelular de boca (Tabela 4).

TABELA 3 - Distribuição de frequência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características clínicas e a história clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Nº de pacientes	%
Localização da lesão		
Língua	57	53,8
Assoalho de boca	28	26,4
Área retromolar	13	12,3
Gengiva inferior	8	7,5
Extensão da lesão		
Restrita ao local de origem	32	30,2
Extensão anatômica adjacente	74	69,8
Aspecto da lesão		
Úlcero-vegetante	37	34,9
Úlcero-infiltrativa	68	64,2
Outro	1	0,9
Estadiamento clínico T		
T1	1	0,9
T2	58	54,7
T3	41	38,7
T4	6	5,7
Estadiamento clínico N		
N0	50	47,2
N+	56	52,8
Estadio clínico		
Estadio II	30	28,3
Estadio III e IV	76	71,7
TOTAL	106	100,0

N+: presença de comprometimento linfonodal cervical; N0: ausência de comprometimento linfonodal cervical.

TABELA 4 - Distribuição de freqüência dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo o tratamento e a evolução clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Nº de pacientes	%
Esvaziamento cervical		
Ipsilateral	88	83,0
Bilateral	18	17,0
Radioterapia adjuvante		
Sim	53	50,0
Não	53	50,0
Recidiva local		
Sim	31	29,2
Não	75	70,8
Recidiva regional		
Sim	18	17,0
Não	88	83,0
Metástase à distância		
Sim	3	2,8
Não	103	97,2
Segundo tumor primário		
Sim	17	16,0
Não	89	84,0
TOTAL	106	100,0

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Cortes representativos de cada espécime tumoral corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, foram analisados quanto à graduação da malignidade no *front* de invasão tumoral, quanto à embolização vascular e quanto às infiltrações perineural, muscular e óssea (FIGURAS 5 e 6). Além disso, analisou-se, microscopicamente, a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas utilizando-se a técnica imuno-histoquímica (FIGURAS 9 e 10).

5.3.1 Graduação da Malignidade Tumoral

A graduação histopatológica de malignidade foi realizada conforme os parâmetros propostos por Bryne et al. (1989), analisando-se o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e a resposta do hospedeiro frente ao tumor na região do *front* de invasão tumoral.

Os resultados obtidos e a distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo as características microscópicas analisadas, podem ser visualizados na Tabela 5.

A maioria dos carcinomas espinocelulares de boca analisados consistia em tumores bem a moderadamente diferenciados caracterizados microscopicamente por intensa (Figura 5A) a moderada queratinização, discreto a moderado polimorfismo nuclear, zero a três figuras de mitoses por campo microscópico e intenso a moderado infiltrado inflamatório mononuclear. O padrão de invasão caracterizado por cordões sólidos/grossos de células neoplásicas (Figura 5A) foi o mais frequentemente observado (Tabela 5).

A variação do escore final de malignidade dos carcinomas espinocelulares de boca foi de 6 a 16 pontos. A maior parte da amostra (84,9%) consistia de tumores bem a moderadamente diferenciados (Figura 5A e 5B), ou seja, pouco agressivos como descrito na Tabela 6.

TABELA 5 - Distribuição de freqüência dos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo o sistema de graduação de malignidade, do *front* de invasão tumoral, de acordo com Bryne et al. (1989) Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	ESCORES DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Grau de queratinização	37 (35,0%)	32 (30,2%)	25 (23,5%)	12 (11,3%)
Polimorfismo nuclear	53 (50,0%)	41 (38,7%)	12 (11,3%)	0 (0,0%)
Número de mitoses	56 (52,8%)	44 (41,5%)	4 (3,8%)	2 (1,9%)
Padrão de invasão	10 (9,4%)	65 (61,4%)	30 (28,3%)	1 (0,9%)
Resposta do hospedeiro	45 (42,5%)	31 (29,3%)	25 (23,5%)	5 (4,7%)

Como visualizado na Tabela 6, 56,6% dos pacientes apresentaram embolização vascular.

A ocorrência de infiltração perineural (Figura 6A), muscular e óssea (Figura 6B) foi observada em 68,9%; 83% e 14,2% dos carcinomas espinocelulares de boca, respectivamente (Tabela 6).

Como descrito previamente todos os pacientes foram submetidos ao esvaziamento cervical, sendo que, em cinquenta e quatro deles (50,9%) foi comprovado, mediante análise histopatológica, o comprometimento linfonodal cervical (pN+), como descrito na Tabela 6.

TABELA 6 - Distribuição de freqüência dos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo as características histopatológicas e o comprometimento linfonodal. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Nº de pacientes	%
Graduação de malignidade		
Pouco agressivo	90	84,9
Muito agressivo	16	15,1
Embolização vascular		
Sim	60	56,6
Não	46	43,4
Infiltração perineural		
Sim	73	68,9
Não	33	31,1
Infiltração muscular		
Sim	88	83,0
Não	18	17,0
Infiltração óssea		
Sim	15	14,2
Não	88	83,0
Desconhecido	3	2,8
Esvaziamento cervical		
pN+	54	50,9
pN0	52	49,1
TOTAL	106	100,0

pN0: ausência de comprometimento linfonodal cervical histopatológico; pN+: presença de comprometimento linfonodal cervical histopatológico.

FIGURA 5 - Carcinoma espinocelular de boca. Em A, observar padrão de invasão em cordões grossos e com intensa queratinização (HE 100X). Em B, CEC de boca pouco queratinizado e com padrão de invasão em cordões finos (HE 200X).

FIGURA 6 – Em A, observar a infiltração perineural do CEC de boca (HE 400X). Em B, observar a infiltração óssea do CEC de boca com um padrão de invasão em cordões grossos (HE 200X).

5.3.2 Avaliação Imuno-Histoquímica

A expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico foi detectada nas camadas do epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado da mucosa bucal com exceção da camada basal e da camada superficial queratinizada (Figura 7). Observou-se ainda, a expressão deste receptor nas fibras musculares lisas das artérias (Figura 8A), sendo esta marcação utilizada como controle positivo interno da reação imuno-histoquímica. Células inflamatórias como linfócitos, ductos das glândulas salivares (Figura 8B), e músculo estriado esquelético também demonstraram imunopositividade para esta molécula.

Nos carcinomas espinocelulares de boca, o receptor $\beta 2$ adrenérgico foi detectado tanto na membrana como no citoplasma das células epiteliais neoplásicas. Os tumores foram classificados como negativos ou positivos com base na ausência ou presença da imunomarcação nas células malignas do *front* de invasão de cada carcinoma (Figuras 9 e 10)

A expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico foi encontrada em 72,6% dos carcinomas espinocelulares de boca sendo que destes 62,7% apresentavam uma expressão forte ou moderada e 37,3% uma fraca expressão dessa proteína nas células malignas. A maioria dos tumores com positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico pertencia a pacientes do gênero masculino e da raça branca, sendo os tumores localizados principalmente em língua e assoalho de boca (Tabela 7).

Uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas e o etilismo ($p=0,021$) e o consumo simultâneo de tabaco e álcool ($p=0,014$), como demonstrado na Tabela 7.

Os pacientes etilistas e/ou tabagistas e etilistas apresentaram uma maior frequência de positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico quando comparados com aqueles que não apresentavam os fatores de risco para a neoplasia maligna (Tabela 7).

TABELA 7 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas nos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo variáveis demográficas e história clínica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Receptor β2 Adrenérgico				p
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Gênero					
Masculino	25	86,2	65	84,4	0,999
Feminino	4	13,8	12	15,6	
Raça					
Branca	26	89,7	67	87,0	0,999
Não branca	3	10,3	10	13,0	
Idade					
≤ 58 anos	19	65,5	36	46,8	0,085
> 58 anos	10	34,5	41	53,2	
Tabagismo[#]					
Sim	23	95,8	66	95,7	0,999
Não	1	4,2	3	4,3	
Etilismo[#]					
Sim	23	92,0	46	68,7	0,021
Não	2	8,0	21	31,3	
Tabagismo + Etilismo[#]					
Sim	22	91,7	44	65,7	0,014
Não	2	8,3	23	34,3	
Localização da lesão					
Língua	12	41,4	45	58,4	NA
Assoalho de boca	10	34,5	18	23,4	
Área retromolar	5	17,2	8	7,8	
Gengiva inferior	2	6,9	6	10,4	
TOTAL	29	100,0	77	100,0	

p: nível descritivo do teste qui-quadrado; Nº: número de carcinomas espinocelulares de boca;

#: excluídos os pacientes com informação desconhecida, NA: não se aplica.

FIGURA 7 – Expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas camadas da mucosa bucal (A, IHQ 100X). Em B, detalhe da ausência de imunomarcacão da camada basal (IHQ 400X).

FIGURA 8 – Expressão do receptor β_2 adrenérgico nas fibras musculares lisas de artéria de médio calibre (A, IHQ 400X) e nos ductos das glândulas salivares mucosas (B, IHQ 400X).

Como pode ser observado na Tabela 8, houve uma associação estatisticamente significativa ($p=0,007$) entre a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico e o tamanho da neoplasia maligna (estadiamento T). A maioria dos tumores com tamanho inferior a 4cm, clinicamente classificados como T1 e T2, apresentavam uma expressão positiva para esta proteína se comparados com os tumores de tamanho maior (T3 e T4). Por outro lado, os tumores negativos para o receptor $\beta 2$ adrenérgico apresentavam estadiamentos clínicos T mais avançados (T3 e T4).

Não foi observada correlação estatisticamente significativa (Tabela 8) entre a expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-receptor $\beta 2$ adrenérgico e as demais variáveis clínicas analisadas, incluindo o tratamento e a evolução (estadiamento N, estágio clínico, radioterapia adjuvante, recidiva locorregional, metástase à distância e segundo tumor primário).

Entretanto, com base nas diferenças numéricas entre os dois grupos (expressão negativa e positiva para o receptor $\beta 2$ adrenérgico) notamos uma tendência a uma pior evolução clínica, caracterizada por uma maior frequência de recidiva locorregional, metástase à distância e segundo tumor primário, nos pacientes com positividade para esta proteína (Tabela 8).

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico em relação as características microscópicas analisadas nos carcinomas espinocelulares de boca (graduação microscópica de malignidade tumoral, embolização vascular, infiltrações perineural, muscular e óssea e comprometimento linfonodal cervical histopatológico), conforme descrito na Tabela 9.

Todavia, um maior número de tumores malignos com embolização vascular, infiltrações perineural, muscular e óssea e comprometimento linfonodal cervical histopatológico demonstraram positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico, reforçando a tendência a pior evolução clínica para os carcinomas espinocelulares que expressaram positivamente esta molécula. (Tabela 9).

TABELA 8 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos carcinomas espinocelulares de boca, segundo estadiamento clínico, tratamento e evolução. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Receptor β2 Adrenérgico				p
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Estadiamento T					
T1 e T2	10	34,5	49	63,6	0,007
T3 e T4	19	65,5	28	36,4	
Estadiamento N					
N+	16	55,2	40	51,9	0,767
N0	13	44,8	37	48,1	
Estádio clínico					
II	6	20,7	24	31,2	0,206
III e IV	23	79,3	53	68,8	
Radioterapia					
Sim	17	58,6	36	46,8	0,276
Não	12	41,4	41	53,2	
Recidiva locorregional					
Sim	14	48,3	30	39,0	0,386
Não	15	51,7	47	61,0	
Metástase à distância					
Sim	0	0,0	3	3,9	0,560
Não	29	100,0	74	96,1	
Segundo tumor					
Sim	4	13,8	13	16,9	0,999
Não	25	86,2	64	83,1	
TOTAL	31	100,0	75	100,0	

p: nível descritivo do teste qui-quadrado; Nº: número de carcinomas espinocelulares de boca.

TABELA 9 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos 106 carcinomas espinocelulares de boca, segundo as variáveis microscópicas de comprometimento linfonodal cervical histopatológico e infiltração neoplásica. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Receptor β2 Adrenérgico				p
	Negativo		Positivo		
	Nº	%	Nº	%	
Graduação de malignidade					
Pouco agressivo	23	79,3	67	87,0	0,366
Muito agressivo	6	20,7	10	13,0	
Embolização vascular					
Sim	17	58,6	43	55,8	0,797
Não	12	41,4	34	44,2	
Infiltração perineural					
Sim	18	62,1	55	71,4	0,354
Não	11	37,9	22	28,6	
Infiltração muscular					
Sim	24	82,8	64	83,1	0,999
Não	5	17,2	13	16,9	
Infiltração óssea [#]					
Sim	5	17,9	10	13,3	0,545
Não	23	82,1	65	86,7	
pN					
pN+	16	55,2	38	49,4	0,593
pN0	13	44,8	39	50,6	
TOTAL	29	100,0	77	100,0	

p: nível descritivo do teste qui-quadrado; Nº: número de carcinomas espinocelulares de boca;

#: excluídos os pacientes com informação desconhecida.

FIGURA 9 – Expressão negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico no CEC de boca (A, IHQ 100X). Em B, detalhe das células malignas e das artérias coradas pelo receptor $\beta 2$ adrenérgico (IHQ 200X).

FIGURA 10 – Expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico no CEC de boca (A, IHQ 100X). Em B, detalhe da pérola córnea negativa para o receptor $\beta 2$ adrenérgico (IHQ 200X).

5.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA

A média do tempo de seguimento clínico dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca foi de 57,97 meses com um desvio padrão de 45,65 (menor tempo de seguimento = 0,03 meses, maior tempo de seguimento = 288,03 meses). Após o final do seguimento, 23 pacientes (21,6%) estavam vivos e sem evidências de recidiva da doença, 8 pacientes (7,5%) morreram por intercorrência cirúrgica, 44 (41,5%) tiveram morte em consequência do câncer, 30 (28,3%) foram a óbito por outras causas não relacionadas ao tumor e um paciente apresentou menos de cinco anos de seguimento sendo, portanto, considerado como perdido de vista.

5.4.1 Análise da Sobrevida Global

As taxas de sobrevida global acumuladas em 5 e 10 anos calculadas pela técnica de Kaplan-Meier em relação as diferentes variáveis estudadas, conforme descrito na Tabela 10.

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa nas probabilidades de sobrevida global em relação a idade dos pacientes, ao comprometimento linfonodal clínico durante a época do diagnóstico (N+) e a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabela 10).

As menores probabilidades de sobrevida global em 5 e 10 anos foram detectadas nos pacientes com idade superior a 58 anos, ou que apresentavam linfonodos regionais clinicamente palpáveis no momento do exame físico (N+) ou com ausência da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabela 10).

A Figura 11 ilustra a comparação entre as curvas de sobrevida global acumulada referente à expressão positiva e negativa do receptor $\beta 2$ adrenérgico, sendo a diferença entre ambas estatisticamente significativa ($p= 0,001$).

A significância estatística da sobrevida global das variáveis descritas acima foi também analisada pelo modelo de regressão de Cox. As variáveis que permaneceram no modelo foram a idade, o estadiamento N e a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabela 11).

TABELA 10 - Análise de sobrevida global acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Sobrevida global		p
	5 anos (%)	10 anos (%)	
Gênero			
Masculino	38,3	24,8	0,217
Feminino	46,7	46,7	
Idade			
≤ 58 anos	47,3	35,4	0,027
> 58 anos	30,6	18,1	
Tabagismo[#]			
Sim	35,7	22,7	0,383
Não	50,0	50,0	
Tabagismo + Etilismo[#]			
Sim	31,8	21,8	0,193
Não	47,5	29,7	
Estadiamento T			
T1 e T2	45,6	30,3	0,065
T3 e T4	31,9	24,3	
Estadiamento N			
N0	53,0	35,2	0,048
N+	27,4	20,1	
Metástase à distância			
Sim	33,3	33,3	0,892
Não	39,6	27,4	
Infiltração perineural			
Sim	36,6	30,1	0,850
Não	45,5	21,0	
Receptor β2 adrenérgico			
Positivo	46,7	32,0	0,001
Negativo	20,7	16,6	

p: nível descritivo do teste log-rank; #: excluídos os pacientes com informação desconhecida.

FIGURA 11 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

A Tabela 11 ilustra as diferenças estatisticamente significativas de cada uma das variáveis analisadas no modelo de regressão de Cox, sendo que pacientes com CEC e idade superior a 58 anos tiveram um risco de morrer 2,138 vezes maior que aqueles com idade igual ou inferior a 58 anos.

O risco de morte para os pacientes com CEC e com comprometimento linfonodal clínico durante a época do diagnóstico foi de 1,891 vezes superior quando comparadas com aqueles sem linfonodos palpáveis (Tabela 11).

Também pode-se observar que pacientes com CEC e expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico apresentam um risco de óbito 0,343 vezes menor que aqueles com CEC que não expressam esta proteína (Tabela 11).

TABELA 11 - Análise de sobrevida global acumulada por meio do modelo de Cox dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Sobrevida global		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>
Idade			
≤ 58 anos (0)	2,138	(1,335; 3,423)	0,002
> 58 anos (1)			
Estadiamento N			
N0 (0)	1,891	(1,187; 3,013)	0,007
N+ (1)			
Receptor β2 adrenérgico			
Negativo (0)	0,343	(0,206; 0,569)	0,000
Positivo (1)			

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança para OR

5.4.2 Análise da Sobrevida Específica por Câncer

A análise da sobrevida específica por câncer em cinco e dez anos, calculada pela técnica de Kaplan-Meier, revelou que as únicas variáveis com significância estatística foram o estadiamento T ($p=0,053$) e a expressão do receptor β2 adrenérgico ($p=0,004$) (Tabela 12).

Como pode ser observado na Tabela 12, os pacientes com CEC e estadiamento T iniciais ou com expressão positiva do receptor β2 adrenérgico sempre apresentaram maiores probabilidades de sobrevida específica por câncer em 5 e 10 anos.

A Figura 12 ilustra a diferença estatisticamente significativa ($p= 0,004$) entre as curvas de sobrevida específica por câncer referente à expressão positiva ou negativa do receptor β2 adrenérgico.

TABELA 12 - Análise de sobrevida específica por câncer por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Sobrevida específica por câncer		
	5 anos (%)	10 anos (%)	<i>p</i>
Gênero			
Masculino	54,4	52,7	0,676
Feminino	59,3	59,3	
Idade			
≤ 58 anos	60,6	58,0	0,245
> 58 anos	48,0	48,0	
Tabagismo[#]			
Sim	50,1	50,1	0,429
Não	75,0	75,0	
Tabagismo + Etilismo[#]			
Sim	46,6	46,6	0,159
Não	61,5	61,5	
Estadiamento T			
T1 e T2	60,5	60,5	0,053
T3 e T4	48,2	44,7	
Estadiamento N			
N0	64,3	61,4	0,218
N+	46,6	46,6	
Metástase à distância			
Sim	33,3	33,3	0,597
Não	55,9	54,3	
Infiltração perineural			
Sim	51,8	51,8	0,344
Não	61,7	57,0	
Receptor β2 adrenérgico			
Positivo	61,0	59,1	0,004
Negativo	40,2	40,2	

p: nível descritivo do teste log rank; #: excluídos os pacientes com informação desconhecida.

FIGURA 12 – Sobrevida específica por câncer dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

Para a análise de sobrevida específica por câncer pelo modelo de regressão de Cox consideraram-se como variáveis categóricas de referência os estadiamentos T1 e T2 e a negatividade da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabela 13).

Como pode ser observado na Tabela 13, a única variável com significância estatística foi a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico, sendo que os pacientes com CEC e imunomarcção positiva para este receptor apresentaram uma probabilidade de óbito 0,454 vezes menor quando comparado aqueles com CEC e com imunomarcção negativa da proteína.

TABELA 13 - Análise de sobrevida global específica por câncer por meio do modelo de Cox dos 106 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2000.

Variável	Sobrevida específica por câncer		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>
Estadiamento T			
T1 e T2 (0)			
T3 e T4 (1)	1,565	(0,854; 2,870)	0,147
Receptor β2 adrenérgico			
Negativo (0)			
Positivo (1)	0,454	(0,240; 0,858)	0,015

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança para OR.

6 – *Discussão*

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o estresse crônico vem sendo estudado como um fator responsável pelo crescimento de tumores malignos, mas os mecanismos pelos quais isto ocorre não estão totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos mostraram que, os mediadores químicos do estresse (cortisol e catecolaminas) podem influenciar o meio ambiente tumoral (UOTILA, 1996; HASEGAWA; SAIKI, 2002; SAUL et al., 2005; THAKER et al., 2006; FLINT et al., 2007; METCALFE et al., 2007; BENISH et al., 2008; BERNABÉ, 2009; GLASNER et al., 2010).

Conhecer os mecanismos responsáveis pelos efeitos do estresse nos tumores humanos é crucial para determinar o real impacto deste fator na tumorigênese. Para entender como os hormônios liberados frente ao estresse interagem e modificam a fisiopatologia da célula maligna, alguns autores (MASUR et al., 2001; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; CARIE; SEBTI, 2007; YU et al., 2007; BENISH et al., 2008; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; PARK et al., 2010) investigaram o papel de um dos principais receptores dos neurotransmissores capaz de mediar a maioria dos efeitos das catecolaminas: o receptor β_2 adrenérgico.

Diversos estudos demonstraram que a ativação do receptor β_2 adrenérgico induz a formação de fatores de transcrição genética envolvidos na proliferação e migração das células malignas, na formação de moléculas relacionadas a angiogênese, na destruição da matriz extracelular e na supressão da resposta imune. Portanto, este receptor adrenérgico vem se destacando como um importante regulador da progressão tumoral em carcinomas de diferentes localizações (UOTILA, 1996; MASUR et al., 2001; SAUL et al., 2005; THAKER et al., 2006; YANG et al., 2006; YU et al., 2007; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009; PARK et al., 2010).

Entretanto, alguns achados heterogêneos referentes aos efeitos do estresse e seus mediadores sobre a proliferação de células neoplásicas foram reportados, principalmente, em relação ao tipo de linhagem celular e a via de sinalização molecular analisada. Por exemplo, enquanto alguns autores demonstraram um

aumento na proliferação de células malignas de esôfago (LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b) e pâncreas (ZHANG et al., 2009) após a ligação de catecolaminas aos receptores adrenérgicos localizados na membrana celular, outros (CARIE; SEBTI, 2007), observaram a inibição do crescimento celular de linhagens de carcinoma de mama com conseqüente regressão dos tumores malignos, causada pela ação dos agonistas farmacológicos dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos.

Particularmente em relação ao carcinoma espinocelular de boca, são poucas e recentes as pesquisas que analisaram o papel do receptor $\beta 2$ adrenérgico nestes tumores. Estudos *in vitro*, de linhagens de carcinoma de boca, mostraram uma associação entre a estimulação do receptor $\beta 2$ adrenérgico e uma maior proliferação e maior capacidade migratória das células neoplásicas (BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009). Além disso, a análise da expressão deste receptor em amostras tumorais humanas foi associada com a ocorrência de metástase linfonodal, a idade do paciente, o tamanho e o estágio clínico do tumor (SHANG; LIU; LIANG, 2009).

Portanto, o presente estudo foi idealizado visando trazer contribuições sobre o significado clínico da expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas, e em especial, sua influência no prognóstico dos pacientes com câncer de boca.

Foi avaliada neste trabalho, uma considerável amostra de carcinomas espinocelulares de boca obtida de pacientes submetidos ao tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo – SP, Brasil, no período de 1970 a 2000. Esta amostra foi constituída de 106 CECs primários de boca, localizados na língua, assoalho de boca, área retromolar e gengiva inferior, clinicamente classificados em estádios II, III e IV.

As características clínicas e demográficas da amostra estudada, como podem ser visualizadas na Tabela 2, refletem um perfil da doença a nível local e mundial, ou seja, a maioria dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca era do gênero masculino e da raça branca, sendo o tabagismo e etilismo, fatores de risco frequentemente observados. Um total de 62,2% dos pacientes eram tabagistas e etilistas simultaneamente, confirmando assim, que a interação entre o tabaco e o álcool incrementa o risco de desenvolvimento desta neoplasia maligna (BINAHMED; NASON; ABDOH, 2007; FAUSTINO et al., 2008; BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009; PEREIRA et al., 2010).

O local de maior acometimento do carcinoma espinocelular foi a língua, seguida pelo assoalho de boca, a área retromolar e a gengiva inferior. O aspecto clínico mais comumente encontrado foi o úlcero-infiltrativo e 69,8% dos tumores se estendiam além de seu local de origem (Tabela 3), características similares às encontradas nos dados levantados por outros autores (KAMINAGAKURA et al., 2010; PEREIRA et al., 2010).

Como descrito na Tabela 3, a maioria (55,6%) dos pacientes de nossa amostra apresentaram CECs de boca com um tamanho menor que 4cm, ou seja, clinicamente classificados como T1 e T2. Entretanto, por causa da grande porcentagem (52,8%) de pacientes com linfonodos regionais clinicamente palpáveis (N+), no momento do diagnóstico, os estádios clínicos avançados (III-IV) foram os predominantes da nossa casuística (Tabela 3).

Ao considerarmos o tratamento, observamos que todos os pacientes com CEC de boca foram submetidos a cirurgia com esvaziamento cervical ipsilateral ou bilateral e destes, 50% receberam radioterapia pós-operatória adjuvante. As metástases linfonodais cervicais permanecem como um dos mais consistentes fatores de prognóstico para os carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço e, ainda hoje, nenhum exame clínico ou marcador biológico pode ser utilizado para determinar com certeza, clinicamente, a ocorrência destas metástases (FERLITO et al., 2006; KOWALSKI; SANABRIA, 2007).

Na amostra estudada podemos observar que o alto índice (52,8%) de pacientes com linfonodos regionais clinicamente palpáveis (N+) justifica a escolha do esvaziamento cervical e da radioterapia adjuvante como terapêutica para os pacientes com CEC de boca.

A análise da evolução clínica dos pacientes, como visualizado na Tabela 4, demonstra que a ocorrência de recidiva foi relatada em 47 pacientes (44,3%), acometendo predominantemente o próprio local do tumor primário (29,2%), seguida pela recidiva regional (17%). Cinco pacientes apresentaram recidiva loco-regional e apenas três pacientes (2,8%) apresentaram comprometimento metastático à distância (Tabela 4). Segundo Woolgar (2006), o estadiamento clínico avançado de uma neoplasia está relacionado ao risco aumentado de recidiva local e/ou regional.

Entre as características histopatológicas das lesões, analisamos a graduação histopatológica de malignidade tumoral, na região do *front* de invasão, conforme os parâmetros propostos por Bryne et al. (1989), baseados no grau de queratinização,

no polimorfismo nuclear, no número de mitoses, no padrão de invasão tumoral e na resposta do hospedeiro frente ao tumor.

A maioria (84,9%) dos carcinomas espinocelulares de boca consistiam em tumores bem a moderadamente diferenciados, ou seja, pouco agressivos (Tabela 6), sendo o padrão de invasão caracterizado por cordões sólidos/grossos de células neoplásicas (Figura 5A), o mais freqüentemente observado (Tabela 5). Outros estudos com casuísticas do mesmo Hospital do Câncer A. C. Camargo também mostraram uma predominância de CEC de boca bem diferenciados e com este mesmo padrão de invasão descrito acima (FAUSTINO et al., 2008; KAMINAGAKURA et al., 2010).

Embora os CECs de boca, no presente estudo, tenham sido considerados como pouco agressivos, a capacidade invasiva destes tumores foi avaliada por outras características histopatológicas examinadas como a ocorrência de embolização vascular, de infiltração perineural, muscular e óssea (Tabela 6), aspectos estes comumente correlacionados com a recidiva e a metástase (WOOLGAR, 2006; LIEBIG et al., 2009).

Em relação à expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico por células malignas, poucos trabalhos foram encontrados na literatura científica (YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009). A ausência de padronização dos sistemas de escores subjetivos empregados, nos trabalhos acima, para determinar a porcentagem de células malignas imunomarcadas pelo receptor $\beta 2$ adrenérgicos nos diferentes tumores consistiu em uma das variáveis que dificultou a comparação entre os resultados. Devemos mencionar ainda que, estes autores, não especificaram qual a área tumoral analisada (YANG et al., 2006; YU et al., 2007; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009), sendo as avaliações imuno-histoquímicas geralmente realizadas em amostras tumorais pequenas e pouco representativas, exceção feita aos estudos de Yu et al. (2007) e de Shang, Liu e Liang (2009) que avaliaram, respectivamente, 98 tumores prostáticos malignos e 65 CECs de boca.

Visando diminuir a subjetividade e estabelecer um método de interpretação padronizado e reproduzível da avaliação imuno-histoquímica, realizamos uma análise automatizada da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células neoplásicas nos 106 CECs de boca. A partir da segmentação das áreas imunomarcadas nos tumores por meio do programa Image J, foi desenvolvido

um programa na linguagem MATLAB que determinou valores numéricos com base na quantidade de pixels marrons das células malignas tumorais (positivamente coradas), como ilustrado na Figura 3.

Embora a utilização do programa MATLAB tenha otimizado a obtenção dos resultados, verificamos que em 13% dos tumores houve uma discordância com a análise subjetiva realizada pelos dois examinadores. Provavelmente isto ocorreu porque, mesmo com o cuidado de capturar imagens dos carcinomas com maior densidade de células malignas, a presença do estroma tumoral, de permeio às ilhotas tumorais com padrão de invasão em cordões sólidos de células neoplásicas, foi inevitável em alguns campos microscópicos (Figura 5A).

A região do estroma tumoral com células inflamatórias como linfócitos e vasos sanguíneos, positivamente marcados para o receptor $\beta 2$ adrenérgico (Figuras 9 e 10), pode ter interferido na análise automatizada, aumentando a quantidade de pixels determinados em cada campo microscópico. Assim sendo, ressaltamos que a avaliação subjetiva da positividade da imunomarcção na região do *front* de invasão tumoral deveria sempre ser realizada, confirmando os resultados e minimizando as discrepâncias que possam vir a ocorrer, quando da utilização de metodologias automatizadas para análises imuno-histoquímicas.

Na mucosa bucal com padrão de normalidade adjacente aos CEC de boca (margem cirúrgicas), a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico foi observada nas células epiteliais, com exceção da camada basal e da camada superficial queratinizada (Figura 7). Estes resultados reforçam aqueles de outros autores que demonstraram, *in vitro*, a presença do receptor $\beta 2$ adrenérgico em queratinócitos do epitélio estratificado pavimentoso da pele e, mais recentemente, da mucosa bucal normal (PULLAR et al., 2006; BERNABÉ, 2009; SIVAMANI et al., 2009; STEENHUIS et al., 2011). Entretanto, deve ser ressaltado que, nestes trabalhos, a expressão deste receptor adrenérgico foi determinada *in vitro* em queratinócitos diferenciados, porém, os mesmos não estavam estratificados em camadas como normalmente se observa nos epitélios da pele e da mucosa bucal.

Além das células epiteliais, observou-se ainda, a expressão de receptor $\beta 2$ adrenérgico nas fibras musculares lisas das artérias (Figura 8A), nos ductos das glândulas salivares (Figura 8B) e no músculo estriado esquelético. Corroborando com estes resultados, Johnson (2006) descreveu em sua completa revisão de

literatura, a ampla distribuição deste receptor $\beta 2$ adrenérgico nos diferentes tecidos, incluindo aqueles descritos em nossa amostra.

A positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico observada nos ductos das glândulas salivares, neste estudo, reforça os achados de Li et al. (2006) que demonstraram esta expressão, por meio da imunofluorescência, na membrana das células ductais de glândula submandibular de coelho.

A imunoexpressão para este receptor também foi observada, em nosso estudo, nas células imunes como linfócitos presentes no estroma tumoral, confirmando os prévios achados de Kohm e Sanders (2001) que determinaram a presença do receptor $\beta 2$ adrenérgico em linfócito B e T.

No que se refere aos carcinomas espinocelulares de boca, o receptor $\beta 2$ adrenérgico foi detectado tanto na membrana como no citoplasma das células epiteliais neoplásicas da maioria destes tumores (72,6%). Esta expressão do receptor variou de leve a intensa, estando ausente nas áreas de intensa queratinização como nas pérolas córneas (Figura 10), concordando com nossos achados descritos para a camada superficial queratinizada (Figura 7A) do epitélio com padrão de normalidade (margens cirúrgicas).

Os pacientes com positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico eram, na maioria, homens brancos, tabagistas e/ou etilistas e com tumores localizados em língua e assoalho de boca (Tabela 7).

Quanto aos fatores de risco para o CEC de boca, houve uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas com o etilismo ($p=0,021$) e o consumo simultâneo de tabaco e álcool ($p=0,014$), como demonstrado na Tabela 7.

Apesar da alta correlação entre estes fatores de risco para o CEC de boca (tabagismo e/ou etilismo) e o receptor $\beta 2$ adrenérgico, esta associação não tem sido descrita em outros estudos sobre câncer de boca, sendo assim, as possíveis vias de sinalização moleculares pelas quais estes fatores interagem e modulam a progressão tumoral, precisam ser detalhadamente investigadas.

Outra característica clínica que apresentou uma associação significativa com a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico foi o estadiamento clínico T ($p=0,007$), ou seja, tumores em fases iniciais, menores que 4cm e clinicamente classificados como T1 e T2, apresentaram uma maior frequência da expressão para este receptor se comparados com os tumores de tamanho maior (T3 e T4), como pode ser

visualizado na Tabela 8. Contrastando com nossos resultados, Shang, Liu e Liang (2009) demonstraram que, a expressão positiva desse receptor em CECs de boca foi significativamente correlacionada com estadiamento clínico T mais avançados ($p=0,001$) e com o comprometimento linfonodal ($p=0,001$).

Mesmo sem diferença estatística significativa e avaliando os resultados, com base nas diferenças numéricas entre a expressão negativa e positiva para o receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabelas 8 e 9), notamos uma tendência a uma pior evolução clínica, caracterizada por uma maior frequência de recidiva locorregional, de metástase à distância, de segundo tumor primário, de embolização vascular, de infiltrações perineural, muscular e óssea e de comprometimento linfonodal cervical histopatológico nos pacientes cujos CECs mostraram positividade para esta proteína.

Em parte esta tendência reforça os achados de Shang, Liu e Liang (2009) ao sugerirem que, a expressão positiva desse receptor em CECs de boca pode desempenhar um importante papel na ocorrência de metástases linfonodais cervicais, influenciando a progressão tumoral e consequentemente, uma evolução clínica desfavorável para o paciente.

Em relação às outras variáveis clínicas analisadas (estadiamento N, estágio clínico, radioterapia adjuvante, recidiva locorregional, metástase a distância e segundo tumor primário) e as características microscópicas (índice de malignidade tumoral, embolização vascular, infiltrações perineural, muscular e óssea e pN) não houve associação significativa com a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico (Tabelas 8 e 9).

A comparação de nossos resultados imuno-histoquímicos com o de outros autores (YANG et al., 2006; YU et al., 2007; YANG et al., 2009) não foi possível pois, a maioria dos estudos, que investigaram a participação do receptor $\beta 2$ adrenérgico em tumores malignos, foram realizados *in vitro* com diferentes linhagens de carcinomas. A participação do receptor $\beta 2$ adrenérgico na progressão de tumores malignos, analisada nestas linhagens celulares, vem sendo correlacionada com o aumento da proliferação e migração celulares e com a formação de moléculas angiogênicas pelas células neoplásicas, fenômenos estes desencadeados pela ação dos hormônios relacionados ao estresse como epinefrina e norepinefrina sobre este receptor. Os efeitos destes hormônios na carcinogênese geralmente são inibidos pelos antagonistas dos receptores $\beta 2$ adrenérgico (MASUR et al., 2001; THAKER et

al., 2006; YANG et al., 2006; LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b; BERNABÉ, 2009; SHANG; LIU; LIANG, 2009; YANG et al., 2009).

Particularmente em relação ao CEC de boca, foi demonstrado que a ativação deste receptor pela epinefrina aumentou a proliferação (BERNABÉ, 2009) e a migração (SHANG; LIU; LIANG, 2009) das células neoplásicas.

A via clássica de ativação do receptor $\beta 2$ adrenérgico (DAAKA; LUTTRELL; LEFKOWITZ, 1997; ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009) resulta na dissociação citoplasmática da proteína G, cuja subunidade $G_{\alpha s}$ estimula à adenilciclase a produzir AMP cíclico (cAMP) ativando a via da proteína quinase A (PKA). Por sua vez, a PKA fosforila diversos fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular e na angiogênese, como detalhadamente descrito na Figura 2 da revisão de literatura.

Entretanto, Carie e Sebtí (2007) ao investigar as possíveis utilidades dos agonistas farmacológicos dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos, observaram que os agonistas farmacológicos inibiram o crescimento celular e induziram a apoptose das linhagens celulares de adenocarcinoma de mama, causando regressão tumoral. Sugeriram então, que estes efeitos foram mediados pelo incremento do cAMP que suprimiu as quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK) 1/2. Todavia estes resultados não foram confirmados em outras linhagens celulares (cólon e pulmão), levando os autores a considerar que a regressão tumoral foi limitada aquelas neoplasias que expressavam receptores $\beta 2$ adrenérgicos e, cuja ativação bloqueou a via de sinalização da ERK 1/2.

Embora a ativação do receptor $\beta 2$ adrenérgico possa influenciar importantes vias de sinalização nas células malignas, outros estudos são necessários para esclarecer seus efeitos no microambiente tumoral, particularmente nos CECs de boca.

A tendência a pior evolução clínica para os pacientes com positividade para o receptor $\beta 2$ adrenérgico, conforme descrito anteriormente, não se confirmou quando da análise do prognóstico realizada pelo Kaplan Meier e pelo modelo de regressão de Cox, que se baseia na probabilidade de sobrevida para os pacientes com CEC de boca.

Os principais fatores que influenciaram a sobrevida global, acumulada em 5 e 10 anos, dos pacientes com CEC de boca foram a idade dos pacientes ($p=0,027$), o comprometimento linfonodal clínico na época do diagnóstico (N+) ($p=$

0,048) e a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas ($p= 0,001$), conforme descrito na Tabela 10.

Os pacientes com idade superior a 58 anos, ou que apresentavam linfonodos regionais clinicamente palpáveis no momento do diagnóstico, ou com ausência da expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células neoplásicas, (Figura 11) tiveram menor probabilidade de sobrevida em 5 e 10 anos (Tabela 10).

O modelo de regressão de Cox revelou como variáveis independentes de prognóstico desfavoráveis: a idade superior a 58 anos e o comprometimento linfonodal clínico na época do diagnóstico. Pacientes com CEC e idade superior a 58 anos tiveram um risco de morrer 2,138 vezes maior se comparados àqueles com idade igual ou inferior a 58 anos. O risco de morte para os pacientes com CEC e com comprometimento linfonodal clínico na época do diagnóstico foi de 1,891 vezes superior quando comparado com aqueles sem linfonodos palpáveis (Tabela 11).

Intrigantemente, a expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico nos CECs de boca se mostrou como uma variável independente de prognóstico favorável, já que o risco de óbito para os pacientes cujos tumores expressam este receptor foi 0,343 vezes menor do que aqueles com CECs sem expressão do receptor (Tabela 11).

Ao analisarmos a sobrevida específica por câncer em 5 e 10 anos (Tabela 12), observamos que os únicos fatores com significância estatística foram o estadiamento T ($p=0,053$) e a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células neoplásicas dos CECs de boca ($p=0,004$), como pode ser visualizado na Figura 12.

Os pacientes com CEC e estadiamento T iniciais ou com expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico sempre apresentaram maiores probabilidades de sobrevida específica por câncer em 5 e 10 anos (Tabela 12).

Concluindo, a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas foi fator independente de prognóstico favorável, já que pacientes com CEC de boca e imunomarcção positiva para este receptor apresentaram uma probabilidade de óbito 0,454 vezes menor que aqueles com CEC e com imunomarcção negativa do receptor (Tabela 13).

Nossos resultados indicam que a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células neoplásicas no *front* de invasão tumoral se mostrou como um fator de prognóstico favorável em pacientes com CEC de boca.

Embora este estudo seja o primeiro a analisar a correlação entre a sobrevida dos pacientes com CEC de boca e a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células malignas, nossos resultados reforçam os achados em câncer de próstata descritos por Yu et al. (2007). Estes autores demonstraram uma correlação, estatisticamente significativa ($p= 0,002$), entre a expressão imuno-histoquímica de receptor $\beta 2$ adrenérgico pelas células neoplásicas e a sobrevida livre de doença dos pacientes com câncer de próstata. Os pacientes que apresentaram tumores com fraca expressão deste receptor tiveram um risco 3,4 vezes maior de desenvolver recidivas quando comparado àqueles com uma forte expressão do receptor. Verificaram também que, tumores primários de próstata com baixa expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico exibiram um pobre prognóstico e, os tumores metastáticos deixaram de expressar este receptor. Sugeriram então, que o receptor $\beta 2$ adrenérgico pode ser utilizado como um biomarcador de prognóstico em câncer de próstata, auxiliando na identificação de pacientes com tumores potencialmente mais agressivos.

Portanto, embora o papel exato do receptor $\beta 2$ adrenérgico no CEC de boca ainda não esteja totalmente esclarecido, nossos resultados sugerem que este receptor pode ser utilizado como um biomarcador de prognóstico. Outras investigações são necessárias para confirmar estes resultados e esclarecer a relevância da ativação das vias de sinalização deste receptor na progressão do câncer de boca, visando a descoberta de novos alvos farmacológicos antineoplásicos.

7 – Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise de 106 carcinomas espinocelulares de boca, com estadiamento clínico II, III e IV, demonstrou:

- uma expressão positiva do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas células neoplásicas da região do *front* de invasão tumoral;
- uma associação significativa ($p=0,007$) entre o receptor $\beta 2$ adrenérgico e os tumores com tamanho inferior a 4cm (cl clinicamente classificados como T1 e T2);
- ausência de associação entre a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico e as variáveis clínicas, microscópicas, de tratamento e evolução analisadas (estadiamento N, estágio clínico, radioterapia adjuvante, recidiva locorregional, metástase à distância e segundo tumor primário, graduação microscópica de malignidade tumoral, embolização vascular, infiltrações perineural, muscular e óssea e comprometimento linfonodal cervical histopatológico);
- que a expressão do receptor $\beta 2$ adrenérgico constituiu um fator de prognóstico favorável, ou seja, os pacientes cujos tumores expressaram positivamente este receptor apresentaram uma menor probabilidade de óbito tanto na sobrevida global, como na sobrevida específica por câncer, acumuladas em cinco e dez anos;

Portanto, podemos concluir que a expressão imuno-histoquímica do receptor $\beta 2$ adrenérgico nas células malignas da região do *front* de invasão tumoral é um fator prognóstico favorável em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e este receptor pode ser utilizado como alvo de novas estratégias farmacológicas antineoplásicas.

Referências

REFERÊNCIAS

AL-WADEI, H. A.; AL-WADEI, M. H.; SCHULLER, H. M. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. **Anticancer Drugs**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 477-82, Jul. 2009.

ANTONI, M. H. et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. **Nat Rev Cancer**, London, v. 6, n. 3, p. 240-8, Mar. 2006.

ASKARI, M. D.; TSAO, M. S.; SCHULLER, H. M. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors. **J Cancer Res Clin Oncol**, Berlin, v. 131, n. 10, p. 639-48, Oct. 2005.

BAGAN, J. V.; SCULLY, C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. **Oral Oncol**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 103-8, Feb. 2008.

BENISH, M. et al. Perioperative use of beta-blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. **Ann Surg Oncol**, New York, v. 15, n. 7, p. 2042-52, Jul. 2008.

BERNABÉ, D. G. **Evidências da associação entre hormônios do estresse e câncer de boca**. 2009. 115 f. Tese (Doutorado em Estomatologia) - Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Araçatuba, 2009.

BINAHMED, A.; NASON, R. W.; ABDON, A. A. The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer. **Oral Oncol**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 780-4, Sep. 2007.

BRODDE, O. E.; BRUCK, H.; LEINEWEBER, K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. **J Pharmacol Sci**, Kyoto, v. 100, n. 5, p. 323-37, Apr. 2006.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 18, n. 8, p. 432-7, Sep. 1989.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Gráfica Flama, 2009. 98 p.

CARIE, A. E.; SEBTI, S. M. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. **Oncogene**, Hampshire, v. 26, n. 26, p. 3777-88, May. 2007.

- COMAN, O. A. et al. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. **Rom J Morphol Embryol**, Bucuresti, v. 50, n. 2, p. 169-79, Mar. 2009.
- COSTANZO, E. S.; SOOD, A. K.; LUTGENDORF, S. K. Biobehavioral influences on cancer progression. **Immunol Allergy Clin North Am**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 109-32, Feb. 2011.
- CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 67, p. 259-84, 2005.
- DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M.; LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, London, v. 390, n. 6655, p. 88-91, Nov. 1997.
- DISTELHORST, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. **Cell Death Differ**, London, v. 9, n. 1, p. 6-19, Jan. 2002.
- DORTA, R. G. et al. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 152-7, Aug. 2002.
- FAUSTINO, S. E. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 37, n. 4, p. 372-8, Apr. 2008.
- FERLITO, A. et al. Elective and therapeutic selective neck dissection. **Oral Oncol**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 14-25, Jan. 2006.
- FITZGERALD, P. J. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer? **Int J Cancer**, New York, v. 124, n. 2, p. 257-63, Jan. 2009.
- FLINT, M. S. et al. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 470-9, Jun. 2007.
- FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst**, Washington, v. 82, n. 1, p. 4-6, Jan. 1990.
- GIDRON, Y.; RONSON, A. Psychosocial factors, biological mediators, and cancer prognosis: a new look at an old story. **Curr Opin Oncol**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 386-92, Jul. 2008.
- GLASNER, A. et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. **J Immunol**, Baltimore, v. 184, n. 5, p. 2449-57, Mar. 2010.

- GOLDSTEIN, D. S. Adrenal responses to stress. **Cell Mol Neurobiol**, New York, v. 30, n. 8, p. 1433-40, Nov. 2010.
- GUIMARAES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacol Rev**, Baltimore, v. 53, n. 2, p. 319-56, Jun. 2001.
- HASEGAWA, H.; SAIKI, I. Psychosocial stress augments tumor development through beta-adrenergic activation in mice. **Jpn J Cancer Res**, Tokyo, v. 93, n. 7, p. 729-35, Jul. 2002.
- JOHNSON, M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 117, n. 1, p. 18-24, Jan. 2006.
- KAMINAGAKURA, E. et al. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. **Head Neck**, New York, v. 32, n. 11, p. 1460-6, Nov. 2010.
- KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacol Rev**, Baltimore, v. 53, n. 4, p. 487-525, Dec. 2001.
- KOWALSKI, L. P.; SANABRIA, A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, Pisa, v. 27, n. 3, p. 113-7, Jun. 2007.
- KVETNANSKY, R.; SABBAN, E. L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. **Physiol Rev**, Washington, v. 89, n. 2, p. 535-606, Apr. 2009.
- LI, Y. M. et al. Expression and functional analysis of beta-adrenoceptor subtypes in rabbit submandibular gland. **Life Sci**, Oxford, v. 79, n. 22, p. 2091-8, Oct. 2006.
- LIEBIG, C. et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. **Cancer**, New York, v. 115, n. 15, p. 3379-91, Aug. 2009.
- LILLBERG, K. et al. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. **Am J Epidemiol**, Baltimore, v. 157, n. 5, p. 415-23, Mar. 2003.
- LIU, X. et al. Epidermal growth factor-induced esophageal cancer cell proliferation requires transactivation of beta-adrenoceptors. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v. 326, n. 1, p. 69-75, Jul. 2008a.
- _____. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta-adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. **J Cell Biochem**, New York, v. 105, n. 1, p. 53-60, Sep. 2008b.

MASUR, K. et al. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. **Cancer Res**, Chicago, v. 61, n. 7, p. 2866-9, Apr. 2001.

MCALLISTER, S. S.; WEINBERG, R. A. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. **J Clin Oncol**, New York, v. 28, n. 26, p. 4022-8, Sep. 2010.

METCALFE, C. et al. The role of self-reported stress in the development of breast cancer and prostate cancer: a prospective cohort study of employed males and females with 30 years of follow-up. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1060-5, Apr. 2007.

ONDICOVA, K.; MRAVEC, B. Role of nervous system in cancer aetiopathogenesis. **Lancet Oncol**, London, v. 11, n. 6, p. 596-601, Jun. 2010.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav Immun**, Orlando, v. 17, n. 1, p. 43-54, Feb. 2003.

PALM, D. et al. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. **Int J Cancer**, Genève, v. 118, n. 11, p. 2744-9, Jun. 2006.

PARK, S. Y. et al. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1alpha protein-dependent mechanism. **Int J Cancer**, Genève, Aug. 2010.

PAWELEC, G.; DERHOVANESEAN, E.; LARBI, A. Immunosenescence and cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, Boca Raton, v. 75, n. 2, p. 165-72, Aug. 2010.

PEREIRA, M. C. et al. The 434(G>C) polymorphism in the eosinophil cationic protein gene and its association with tissue eosinophilia in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 39, n. 1, p. 56-62, Jan. 2010.

POWELL, J. A.; DUELL, E. A.; VOORHEES, J. J. Beta adrenergic stimulation of endogenous epidermal cyclic AMP formation. **Arch Dermatol**, Chicago, v. 104, n. 4, p. 359-65, Oct. 1971 apud SIVAMANI, R. K.; LAM, S. T.; ISSEROFF, R. R. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. **Dermatol Clin**, Philadelphia, v. 25, n. 4, p. 643-53, Oct. 2007.

PULLAR, C. E. et al. Beta2-adrenergic receptor activation delays wound healing. **FASEB J**, Bethesda, v. 20, n. 1, p. 76-86, Jan. 2006.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, London, v. 459, n. 7245, p. 356-63, May. 2009.

SAMPAIO-GÓES, F. C. G. et al. Expression of PCNA, p53, Bax, and Bcl-X in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: Relationships with prognosis. **Head & Neck**, New York, v. 27, n. 11, p. 982-89, Nov. 2005.

SAUL, A. N. et al. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v. 97, n. 23, p. 1760-7, Dec. 2005.

SCHULLER, H. M.; CEKANOVA, M. NNK-induced hamster lung adenocarcinomas over-express beta2-adrenergic and EGFR signaling pathways. **Lung Cancer**, Limerick, v. 49, n. 1, p. 35-45, Jul. 2005.

SELYE, H.; HORAVA, A. Request for reprints concerning stress and the adaptive hormones. **Can Med Assoc J**, Toronto, v. 68, n. 3, p. 298, Mar. 1953.

SEPHTON, S. E. et al. Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. **Brain Behav Immun**, Orlando, v. 23, n. 8, p. 1148-55, Nov. 2009.

SHANG, Z. J.; LIU, K.; LIANG, F. Expression of beta2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 38, n. 4, p. 371-6, Apr 2009.

SHI, S.-R. et al. Sensitivity and Detection Efficiency of a Novel Two-Step Detection System (PowerVision) for Immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, Hagerstown, v. 7, n. 3, p. 201, Sept. 1999.

SIVAMANI, R. K.; LAM, S. T.; ISSEROFF, R. R. Beta adrenergic receptors in keratinocytes. **Dermatol Clin**, Philadelphia, v. 25, n. 4, p. 643-53, Oct. 2007.

SIVAMANI, R. K. et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. **PLoS Med**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e12, Jan. 2009.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM**: classification of malignant tumors. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, INC., 2002.

STEENHUIS, P. et al. Adrenergic signaling in human oral keratinocytes and wound repair. **J Dent Res**, Chicago, v. 90, n. 2, p. 186-92, Feb. 2011.

THAKER, P. H. et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nat Med**, New York, v. 12, n. 8, p. 939-44, Aug. 2006.

THAKER, P. H.; LUTGENDORF, S. K.; SOOD, A. K. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 6, n. 4, p. 430-3, Feb. 2007.

THAKER, P. H.; SOOD, A. K. Neuroendocrine influences on cancer biology. **Semin Cancer Biol**, London, v. 18, n. 3, p. 164-70, Jun. 2008.

UDAGAWA, T.; WOOD, M. Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. **Curr Opin Pharmacol**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 369-74, Aug. 2010.

UOTILA, P. The role of cyclic AMP and oxygen intermediates in the inhibition of cellular immunity in cancer. **Cancer Immunol Immunother**, Berlin, v. 43, n. 1, p. 1-9, Sep. 1996.

WOOLGAR, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 229-39, Mar. 2006.

YANG, E. V. et al. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. **Brain Behav Immun**, Orlando, v. 23, n. 2, p. 267-75, Feb. 2009.

_____. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. **Cancer Res**, Chicago, v. 66, n. 21, p. 10357-64, Nov. 2006.

YAQUB, S.; AANDAHL, E. M. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. **Crit Rev Oncog**, New York, v. 15, n. 1-2, p. 43-63, 2009.

YU, J. et al. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 12, n. 5, p. 419-31, Nov. 2007.

ZHANG, D. et al. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell. **Pancreas**, Hagerstown, v. 38, n. 1, p. 94-100, Jan. 2009.

Anexo

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Abril de 2010.

Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1385/10

“Expressão de receptor beta-2-adrenérgico em carcinoma espinocelular de boca e sua associação com a evolução clínica tumoral”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 13/04/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Financiamento da Pesquisa;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa