LILIAN PIRES BARBETA

**Avaliação da expressão gênica da proteína 2 ligante
de SH3 ativadora da GTPase de Ras (G3BP2), do fator
tecidual (TF) e da sua isoforma asHTF como
possíveis marcadores prognósticos em carcinoma
epidermóide de cabeça e pescoço**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Hatsue
Honda Federico**

**São Paulo
2009**

LILIAN PIRES BARBETA

**Avaliação da expressão gênica da proteína 2
ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras
(G3BP2), do fator tecidual (TF) e da sua
isoforma asHTF como possíveis marcadores
prognósticos em carcinoma epidermóide de
cabeça e pescoço**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico**

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbeta, Lilian Pires

Avaliação da expressão gênica da proteína 2 ligante de SH3 ativadora da GTPase e de Ras (G3BP2), do fator tecidual (TF) e da sua isoforma asHTF como possíveis marcadores prognósticos em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Lilian Pires Barbeta. -- São Paulo, 2009.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Miriam Hatsue Honda Federico.

Descritores: 1.Expressão gênica 2.Neoplasias de cabeça e pescoço 3.Carcinoma de células escamosas 4.Tromboplastina 5.Sobrevida

USP/FM/SBD-318/09

Dedicatória

*A minha família por sempre
me apoiar em todos os momentos
difíceis e compartilhar das alegrias*

Agradecimentos

Aos meus pais Antonio Marcos Barbeta e Gilda Maria Pires Barbeta por sempre me mostrarem o caminho certo e correto a seguir, por me orientar ser sempre uma pessoa honesta e lutadora, por sempre valorizar o meu esforço e me apoiarem financeiramente e emocionalmente durante todos os anos da minha vida. Essa dissertação é resultado de todo investimento de vocês, amo muito os dois.

Aos meus queridos irmãos Eduardo e Denise Pires Barbeta pelas brigas, impaciência, ajuda, carinho e por todos os momentos que fazem da gente uma grande família. Ao bebe da casa (Sacha) por sempre pedir colo quando precisava estudar, mas que sempre nos consola e ama incondicionalmente.

A todos meus tios, primos e amigos que acompanham essa minha luta desde o inicio da graduação e sempre me apoiaram e me deram forças para continuar. Aos meus avôs (Angela, Mário e Antonio; em memória) por terem compartilhado da minha infância.

À minha Tia Lidiangela (Tia Lili; em memória) por ter me ensinado que mesmo durante todas as dificuldades físicas ainda é possível fazer coisas maravilhosas e ser uma pessoa admirável, tia, sinto saudades.

Especialmente a minha avó Helena que aos seus 85 anos mesmo sem entender nada de biologia ou de câncer sempre me apoiou e esteve ao meu lado nesta caminhada, principalmente neste último mês estando muito doente sempre tem uma palavra de alegria e apoio. *Nonna* dedico essa dissertação a você.

Aos meus amigos e “irmãos” Karen Cristina Sant’Anna Brunialti, Bruno Ferencz Papp Cadima, Karina Augusto Escobar, Dra. Cristina Meireles Campofiorito, Adriana Priscila Trapé, Mateus de Camargo Barros Filho e Laura Tojeiro Campos pela amizade, risadas, apoio, carinho, luz em momentos de escuridão e compreensão. Vocês foram a minha força, o meu espelho e meu ouvido. Obrigado por fazerem parte da minha vida. Sem vocês nada disso teria sido possível.

À Profa. Dra Miriam Hatsue Honda Federico pela oportunidade de desenvolver essa dissertação, orientação e paciência.

À Dra Fátima Solange Pasini pelo auxílio, amizade, paciência e empenho na concretização deste estudo.

Às colegas de grupo Dra Flávia Mangone e Dra Simone Maistro pela ajuda, amizade e compreensão.

Ao Dr. Igor Snitkovisky por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos estagiários Marcela Forli, Juliana Yamaguchi, Camila Godoi e Theo Arra pela grande ajuda durante todos esses anos e pela amizade.

À Profa. Dra Maria Mitzi Brentani pela oportunidade de realizar este trabalho. Ao Prof. Dr Roger Chammas, coordenador do programa de pós-graduação do programa de Oncologia e a todos de seu grupo. Especialmente a Mara Junqueira pelo auxílio nos experimentos de Western Blotting, amizade e carinho.

A todos os colegas do Lim 24 principalmente, Dra Maria Lucia Hirata Katayama, Dra Patrícia Bortman Rozencham, Dra Rosimeire Roela, Dra

Natália Bromberg, Cíntia Milani, Suzana Terumi Honda, Paulo Del Valle, Yuri Urata, Carla Pinheiro, Elen Pereira Bastos, Simone Crestoni Fernandes, Arthur Willian Alvarenga, Ticiane, Renata, Leonardo, Larissa, Marcos, Márcia, Camila Maximo e Maira Martinez.

A Maria José Benevides, Elizangela Dias, Rosilene Arruda, Jair Cláudio, Willame Macedo e Ivonete Lima, por tudo que sempre fizeram por mim e por todos no laboratório, vocês são parte desta dissertação.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa. E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Sumário

Sumário

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivo Específico.....	12
3. Casuística e Métodos	13
3.1. Casuística.....	14
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Extração do RNA total	18
3.2.2. Preparação e verificação do cDNA.....	20
3.2.3. PCR em tempo real	22
3.2.4. Seleção dos genes Normalizadores.....	24
3.2.5. Extratos Protéicos	30
3.2.6. Dosagem Protéica.....	30
3.2.8. Análise estatística.....	32
4. Resultados.....	34
4.1. Expressão de G3BP2, TF e asHTF em CE de cavidade oral.....	35
4.2. Expressão de G3BP2, TF e asHTF para CE de língua.	47
4.3. Expressão de G3BP2, TF e asHTF para CE de laringe.	55
5. Discussão	63
6. Conclusão.....	73
7. Referências Bibliográficas	75

Lista de Abreviaturas e siglas

Lista de Siglas

M – Molar
mM – milimolar
μM – micromolar
nM – nanomolar
ml – mililitro
μl – microlitro
mg – miligrama
μg – micrograma
ng – nanograma
pb – pares de bases
U – unidades

Lista de abreviaturas

18S – subunidade 18S RNA ribossomal
28S – subunidade 28S RNA ribossomal
Akt/PKB – do inglês, *Protein kinase B*
asHTF – do inglês, *Alternatively Spliced Human Tissue Factor*
B2M – Beta-2-microglobulina
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
CE – Carcinoma epidermóide
COX-2 – Cicloxigenase 2
C_t – Ciclo do *Threshold*
CTGF – do inglês, *Connective Tissue Growth Factor*
Cyr61 – do inglês, *Cysteine-Rich, Angiogenic Inducer, 61*
DDRT-PCR - *Differential display RT-PCR*
DEPC – dietilpirocarbonato
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – desoxirribonucleico
EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
egr-1 – do inglês, *Early Growth Response 1*
GUSB – beta-glucuronidase

HMBS – Hidroximetilbilano sintase

HPRT1 – do inglês, *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

INRAD – Instituto de Radiologia

G3BP – Proteína ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras

G3BP2 – Proteína 2 ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras

HER-2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano-2

IL-6 – Intereucina 6

IL-8 – Interleucina 8

INCA – Instituto Nacional do Câncer

mTOR – do inglês, *Mechanistic Target of Rapamycin (serine/threonine kinase)*

NF- κ B - do inglês, Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells

PAR – do inglês, *Protease-activated Receptors*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PPIA – Peptidil-prolil isomerase A

pN0 – linfonodo não comprometido

pN+ - linfonodo comprometido

RPLP0 – proteína ribossomal grande P0

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

RT – do inglês, *Reverse Transcriptase*

TBP – proteína ligada à região TATA

TF – Fator tecidual

TFRC – receptor de transferrina

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TUBA6 – alfa tubulina 1c

UICC – União Internacional Contra o Câncer

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Expressão diferencial de genes através da técnica de DDT-PCR.....	4
Figura 2 - Representação esquemática dos exons (A) e da proteína (B) de TF e asHTF	8
Figura 3 - Extração de RNA total.....	20
Figura 4 - Gráficos calculados pelo programa <i>Genorm</i> para os genes mais estáveis.....	29
Figura 5 - Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF no tumor primário e mucosa adjacente em carcinoma epidermoide de cavidade oral.....	36
Figura 6 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F).....	41
Figura 7 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H).....	43
Figura 8 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F).....	45
Figura 9 - Comparação dos dados da expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF entre tecido de tumor primário e mucosa adjacente provenientes dos pacientes com CE de língua.....	47

Figura 10 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F)..... 51

Figura 11 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H).....52

Figura 12 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F).....54

Figura 13 - Comparação dos dados da expressão do gene G3BP2 entre tecido de tumor primário e mucosa adjacente proveniente de 17 pacientes, com carcinoma epidermóide de laringe.....55

Figura 14 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F).....59

Figura 15 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H).....60

Figura 16 - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F).....62

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas e patológicas de 148 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	17
Tabela 2 - Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR da <i>β-actina</i>	21
Tabela 3 - Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR em tempo real.....	23
Tabela 4- Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR em tempo real para a escolha dos normalizadores.....	25
Tabela 5- Temperaturas da PCR em tempo real, concentração dos oligonucleotídeos e concentração de MgCl ₂ padronizados para os candidatos a genes normalizadores.....	28
Tabela 6- Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral (excluindo língua): em relação as características clínicas.....	38
Tabela 7- Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral (excluindo língua): em relação as características patológicas.....	39
Tabela 8- Regressão de COX para a sobrevida livre de doença dos fatores: tamanho do tumor, grau de diferenciação celular, comprometimento ou não dos linfonodos, expressão de G3BP2, TF e da sua isoforma asHTF em pacientes com CE de cavidade oral (excluindo língua).....	46

Tabela 9- Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de língua: em relação as características clínicas.....49

Tabela 10- Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de língua: em relação as características patológicas.....50

Tabela 11 - Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de laringe: em relação as características clínicas.....57

Tabela 12: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de laringe: em relação as características patológicas.....58

Resumo

Barbeta, LP. *Avaliação da expressão gênica da proteína 2 ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras (G3BP2), do fator tecidual (TF) e da sua isoforma asHTF como possíveis marcadores prognósticos em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 82p.

Proteína 2 ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras (G3BP2) parece estar envolvido em vias importantes de sobrevivência celular como a via do NF- κ B. Já o fator tecidual (TF) e sua isoforma asHTF parecem estar envolvidos nos processos de angiogênese, proliferação e metástase. Assim, os genes G3BP2, TF e asHTF parecem possíveis fatores prognósticos em carcinoma epidermóide (CE) de cabeça e pescoço. Para avaliar a importância desses genes nesse tipo de câncer, foi realizada a quantificação da expressão do RNAm desses marcadores por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real em tumores primário e mucosas adjacente de 148 pacientes com CE de cavidade oral, língua e laringe e a proteína de TF e asHTF foi determinada por Western blotting em 17 pacientes com CE de cavidade oral. Os dados da expressão do RNAm foram correlacionados com variáveis clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes. A expressão relativa do RNAm de G3BP2 foi menor nos tumores primários em relação à mucosa adjacente em todos os sítios analisados. TF e asHTF não apresentaram nenhuma correlação entre a expressão relativa no tumor primário e na mucosa adjacente para os três sítios analisados. Quando comparados aos tumores sem comprometimento linfonodal (pN0), tumores de cavidade oral e língua com comprometimento linfonodal (pN+) apresentaram maior expressão de TF ($P=0,003$; $P=0,033$, respectivamente) e de asHTF ($P=0,004$; $P=0,018$, respectivamente – Teste não paramétrico de Mann-Whitney). Em seguida, construímos as curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier considerando como positivos os pacientes com expressão maior que a mediana para cada marcador. Para os CE de cavidade oral, pacientes com expressão positiva dos genes TF ($P=0,034$ – Teste Log-rank) e asHTF ($P=0,010$) apresentaram pior sobrevida livre de doença na análise univariada. Quando realizado a análise multivariada tanto TF como asHTF mantiveram a significância estatística ($P=0,002$ para ambos os genes), sugerindo, assim, serem fatores prognósticos independentes. A análise da proteína apontou 76,4% de concordância no padrão de expressão do RNAm de TF e 58,8% para a expressão do RNAm de asHTF. Não foi observada nenhuma correlação entre esses marcadores com outros dados clínico-patológicos e nem com a sobrevida dos pacientes para os tumores de língua e laringe. Assim, sugerimos que a expressão de TF e asHTF parecem ser marcadores prognósticos nos CE de cavidade oral principalmente em relação à sobrevida livre de doença. Apoio FAPESP 06/53755-5.

Descritores: 1. Expressão gênica 2. Neoplasias de cabeça e pescoço 3. Carcinoma de células escamosas 4. Tromboplastina 5. Sobrevida

Summary

Barbeta, LP. *Evaluation of gene expression GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2), tissue factor (TF) and its isoform asHTF as possible prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma.* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 82p.

GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2) seems to be involved in pathways important for cell survival as NF- κ B pathway. Tissue factor (TF) and its isoform asHTF appear to be involved in angiogenesis, proliferation and metastasis. Thus, the genes G3BP2, TF and asHTF seem possible prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma (SCC). To assess the importance of these genes in this type of cancer, we performed mRNA expression analysis of these markers by real time PCR (polymerase chain reaction) in primary tumors and adjacent mucosa of 148 patients with oral cavity, tongue and larynx SCC. TF and asHTF protein was determined by Western blotting in 17 patients with oral cavity SCC. mRNA expression levels were correlated with clinical and pathological variables and survival of patients. G3BP2 mRNA expression was lower in primary tumors as compared to adjacent mucosa at all sites analyzed. No difference was found between TF and asHTF expression in primary tumors and adjacent mucosa in the whole group. TF and asHTF levels mRNA expression were higher in pN+ tumors as compared to pN0 in oral cavity ($P=0.003$, $P=0.004$, respectively) and tongue ($P=0.033$, $P=0.018$, respectively - Mann-Whitney test) tumors. For Kaplan Meier survival analysis patients were categorized positive (expression > tumor median relative expression) and negative (expression $\leq$ tumor median relative expression). For oral cavity SCC, patients with positive expression of TF ($P=0.034$ - log-rank test) and asHTF ($P=0.010$) genes presented shorter disease-free survival in univariate analysis. In multivariate analysis both TF as asHTF retained statistical significance ($P=0.002$ for both genes), suggesting, therefore, are independent prognostic factors. Protein analysis showed 76.4% agreement with mRNA expression for TF and 58.8% for asHTF. In patients with tongue and larynx tumors there correlation were not found. Thus, we suggest that the TF and asHTF expression seem to be prognostic markers in oral cavity SCC especially in relation to disease-free survival. Supported by FAPESP 06/53755-5.

Descriptors: 1. Gene expression 2. Head and neck neoplasm 3. Carcinoma, squamous cell 4. Thromboplastin 5. Survivorship (Public Health)

1. Introdução

O carcinoma epidermóide (CE) de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais freqüente sendo um problema de saúde que contabiliza 350 mil mortes no mundo a cada ano (Parkin et al., 2005). No Brasil, não existem dados exatos, mas a importância epidemiológica desse tipo de câncer pode ser deduzida pela estimativa de incidência que para 2008 é de 14160 novos casos, só de carcinomas de cavidade oral (INCA, 2007).

O principal fator de risco é a exposição a carcinógenos presentes no tabaco e álcool (União Internacional Contra o Câncer (UICC), 1999; Argiris et al., 2008). Além disso, questiona-se se certos polimorfismos genéticos poderiam também influenciar o risco da doença (Hashibe et al., 2006, Sturgis & Wei, 2002).

Trata-se de um câncer que atinge predominantemente homens, em idade economicamente ativa, antes dos 60 anos (Argiris et al., 2008). Além disso, mais de 50% dos casos são diagnosticados em estágio avançado (Almadori et al., 2008), o que diminui a possibilidade de ressecção cirúrgica com intenção curativa. Para os tumores ressecáveis, o fator prognóstico mais importante, que aumenta a chance de recidiva é a presença de comprometimento linfonodal (Agra et al., 2006). Deve-se dizer, no entanto, que este não é um fator prognóstico absoluto, pois nem sempre ausência de linfonodos comprometidos é certeza de sobrevida longa e nenhum parâmetro clínico-patológico parece ser absoluto nesse sentido [União Internacional Contra o Câncer (UICC), 1999]. Isso indica a necessidade de identificação de outros fatores prognósticos para auxiliar no planejamento da doença.

Como o câncer de uma forma geral é resultado de uma multiplicidade de acontecimentos genéticos, que inativa genes supressores tumorais e ativa proto-oncogenes, as técnicas moleculares podem auxiliar na identificação dessas alterações nas diferentes etapas da carcinogênese (Argiris et al., 2008) e consequentemente encontrar os possíveis marcadores moleculares indicativos de prognóstico. Embora vários desses marcadores já tenham sido propostos, tais como a proteína HER-2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano-2; Xia et al., 1997), a maior expressão de EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal; Almadori et al., 2008; Ang et al., 2004; Maurizi et al., 1996), p53 (Almadori et al., 2008; revisito por Bettendorf et al., 2004; Gleich & Salamone, 2002), a super expressão e a amplificação do gene da ciclina D1, COX-2 (Cicloxigenase 2), Gelactina-3 (Almadori et al., 2008), nenhum parece ser ainda de utilidade clínica.

Assim, com objetivo de identificar novos biomarcadores que possam ser preditivos de prognóstico ou de comprometimento linfonodal, nosso grupo utilizou a metodologia de *Differential display* RT-PCR (DDRT-PCR), comparando mucosa adjacente, tumores primários da cavidade oral (excluindo tumores de língua) com (pN+) ou sem (pN0) comprometimento linfonodal (Pasini, 2005). Essa abordagem apontou 63 genes, dentre os quais TF (Fator tecidual) apresentou uma maior expressão no tumor primário pN+ quando comparado ao tumor primário pN0 ou a mucosa adjacente (Figura 1). O G3BP2 (Proteína 2 ligante de SH3 ativadora da GTPase de Ras), por outro lado, pareceu mais expresso na mucosa adjacente quando comparado ao tumor primário pN0 ou pN+ (Figura 1).

Figura 1: Expressão diferencial de genes através da técnica de DDT-PCR. A figura mostra os autoradiogramas correspondentes aos ensaios de DDT-PCR onde foram comparadas misturas de RNA de mucosa adjacente (1), tumor primário pN0 (2) e tumor primário pN+ (3), provenientes de CE de cavidade oral (excluindo os tumores de língua). As amplificações foram feitas com os oligonucleotídeos de ancoragem T11VA e T11VG e os oligonucleotídeos aleatórios PR13, PR14 e PR15.

A família G3BP foi primeiramente identificada por uma coimunoprecipitação com o domínio SH3 da proteína Ras-GAP (Parker et al., 1996). Essa proteína, Ras-GAP, funciona como um regulador negativo de Ras (Tocque et al., 1997; Bernards & Settleman, 2005), isto é, Ras-GAP hidrolisa o GTP ligado à molécula de Ras transformando-o em GDP e conseqüentemente mantendo-o inativo (Geyer & Wittinghofer, 1997; Tocque et al., 1997; Bernards & Settleman, 2005; Le & Parada, 2007). A coimunoprecipitação observada entre Ras-GAP e G3BP ocorre apenas nas células em crescimento e dependem do estado de ativação de Ras (Parker et al., 1996).

A família das G3BPs é codificada por dois genes, o G3BP e o G3BP2 que estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 5q33.1 e 4q21.1 e apresentam grande similaridade de nucleotídeos (61%) e de aminoácidos (59%). As G3BPs podem estar envolvidas na proliferação celular e na formação ou progressão tumoral (French et al., 2002), além de regularem a atividade da proteína p53 (Kim et al., 2007). Além disso, podem estar envolvidas com a sinalização de *ras*, *c-myc*, NF-Kappa β , sistema proteossoma da ubiquitina e a sinalização de Her2 (Revisado por Irvine et al., 2004).

A proteína de G3BP2 pode ligar-se com a molécula I κ B α e com o complexo I κ B α /NF- κ B, mantendo-as no citoplasma (Prigent et al., 2000). Esses autores verificaram que apenas a presença do domínio ácido de G3BP2 era suficientemente capaz de interagir com a molécula I κ B α e com o complexo I κ B α /NF- κ B. Essa interação é importante, uma vez que o I κ B α é um inibidor de NF- κ B no citoplasma; estando NF- κ B livre do complexo torna-se capaz de migrar para o núcleo (Chen e Goeddel, 2002; Prigent et al., 2000), ligando-se ao seu sítio no DNA (Li & Verma, 2002) e ativando genes que promovem a proliferação celular e genes codificam proteínas anti-apoptóticas (Li et al., 2005). Com isso, a desregulação do NF- κ B, observado em diferentes carcinomas, parece ter um impacto dramático sobre seu potencial metastático (Bindhu et al., 2006).

Pouco se sabe sobre a expressão de G3BP2 em tumores. Entretanto, o trabalho de French et al., 2002 demonstraram uma maior expressão da

proteína de G3BP2 em 88% de 56 tumores de mama e que quase não foi detectado no tecido normal adjacente, além disso, o aumento dessa proteína ocorreu em paralelo com a progressão tumoral e não como uma consequência da formação do câncer.

O fator tecidual (TF, F3, TFA ou CD142) é outro marcador expresso em uma variedade de tecidos normais, principalmente no tecido epidermal e no sistema nervoso, além de ser expresso em células tumorais. O complexo formado pelo TF com o fator VIIa regula a expressão de múltiplos genes como: Akt/PKB (*Protein kinase B*; Versteeg et al., 2000), *egr-1* (*Early Growth Response 1*; Camerer et al., 1999), IL-8 (Interleucina 8; Hjortoe et al., 2004), Cyr61 (*Cysteine-Rich, Angiogenic Inducer, 61*; Rao & Pendurthi, 2005; Pendurthi et al., 2002), e CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*; Rao & Pendurthi, 2005). Por essa razão, acredita-se que ele esteja envolvido na angiogênese, na proliferação tumoral e no processo de metástase (Toomey et al., 1997).

O TF é uma glicoproteína transmembrânica que inicia a cascata de coagulação. Esta cascata é ativada quando um vaso sanguíneo sofre uma lesão e expõe o TF que se encontra nas células da camada média e adventícia expostas ao fluxo sanguíneo. O fator VII circulante liga-se ao TF e é convertido em fator VIIa. Este complexo recruta o fator X convertendo-o em fator Xa que transforma a prototrombina em trombina induzindo, assim, a formação da fibrina e, conseqüentemente, iniciando a restauração da lesão (Versteeg et al., 2004).

A expressão de TF foi descrita em uma variedade de tumores. Rong et al. (2005) observaram, por *Western blot*, *Northern blot* e imunohistoquímica, que a perda do supressor de tumor PTEN e a hipóxia levava ao aumento da expressão de TF em células de glioma. Em câncer de cólon foi observado, por imunohistoquímica, uma maior expressão de TF nos pacientes com metástase linfonodal em relação aos pacientes sem metástase linfonodal, sugerindo uma relação próxima entre a expressão de TF e a ocorrência de metástases (Nakasaki et al., 2002). Em adenocarcinoma de ducto pancreático, pacientes negativos para a proteína de TF apresentaram um melhor prognóstico mesmo quando apresentavam linfonodos comprometidos (Nitori et al., 2005). Porém, quando compararam carcinoma de células renais, câncer de bexiga e de próstata com tecidos normais, por RT-PCR quantitativo, encontraram uma expressão diminuída nos carcinomas (Forster et al., 2003). Em uma linhagem celular de câncer de mama tanto o complexo TF-FVIIa como o complexo TF-FVIIa-Fxa induziram a fosforilação de p44/42 MAPK (Jiang et al., 2004) e a fosforilação da via do Akt/PKB e mTOR, o que levou a um aumento da migração celular, um passo chave para a metástase (Jiang et al., 2008). Além disso, o RNAm de TF também foi encontrado em neoplasias benignas de tireóide (Buchs et al., 2003) e a proteína de TF foi observada em carcinoma de laringe (Wojtukiewicz et al., 1999).

Bogdanov et al. (2003) observaram a existência de uma isoforma de TF denominada asHTF cujo exon 5 estava ausente (Figura 2), apresentando 206 aminoácidos e contendo 160 bases a menos que o TF, sendo

encontrada em células normais de placenta, em pâncreas, monócitos CD14+ e em pulmão. Diferentemente de TF, o asHTF é solúvel e circulante no plasma, e mantém a sua atividade biológica. Szotowski et al. (2005) demonstraram que TNF- α e IL-6 induzem o RNAm e a proteína de asHTF em células endoteliais da veia umbilical humana que é capaz de sustentar a conversão do fator X na presença do fator VIIa comprovando, assim, sua atividade biológica na formação do trombo.

Figura 2: Representação esquemática dos exons (A) e da proteína (B) de TF e asHTF (Modificado de Signaevsky et al., 2008).

Em câncer de pâncreas o asHTF parece aumentar o crescimento do câncer em camundongos independente da atividade procoagulante da molécula original (Signaevsky et al., 2008). Em outro estudo em câncer de

pâncreas foi observado que das seis linhagens celulares, cinco apresentaram expressão do RNAm e da proteína de asHTF e em fibroblastos humanos normais asHTF não foi expresso (Hobbs et al., 2007). Além disso, estes autores fizeram transfecção da linhagem celular MiaPaCa que expressava asHTF em camundongos e observaram que a expressão deste gene promovia o crescimento tumoral associado ao aumento da proliferação e da angiogenese *in vivo* (Hobbs et al., 2007). Em câncer de pulmão de células não pequenas um estudo mostrou que a expressão do RNAm de asHTF foi maior em pacientes com estadios mais avançados da doença, apontando-o como um marcador de malignidade e metástase (Goldin-Lang et al., 2008).

No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço não existem dados na literatura que demonstrem a expressão de G3BP2 e asHTF. Frente a isso, durante o desenvolvimento do meu aprimoramento (Programa de Aprimoramento Pessoal do Hospital das Clínicas e FMUSP/FUNDAP) realizamos um estudo preliminar que consistiu na validação da expressão desses genes pelas técnicas de PCR em tempo real para o G3BP2 e PCR semi-quantitativo para as isoformas de TF em um grupo de 44 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral. A expressão de G3BP2 mostrou uma relação com sobrevida, onde pacientes com tumores positivos (expressão maior que a mediana dos tumores) apresentaram uma melhor sobrevida em relação aos tumores negativos (expressão igual ou abaixo que a mediana dos tumores). Para a expressão de asHTF foi observado uma maior expressão, no carcinoma epidermóide de cavidade oral em relação a

mucosa adjacente, porém significativamente marginal. Além disso, TF apresentou uma maior média de expressão nos tumores do grupo de pacientes pN+ em relação ao grupo pN0.

Desta forma, nosso objetivo foi o de realizar uma análise da expressão gênica de G3BP2 em um maior número de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Além disso, determinar a expressão dos RNAm de TF e sua isoforma asHTF em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, prospectivamente, a utilização da expressão do RNAm de G3BP2 como marcador prognóstico de sobrevida para pacientes com câncer epidermóide de cabeça e pescoço bem como determinar a expressão dos RNAm de TF e sua isoforma asHTF em tumor primário e mucosa adjacente provenientes de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

2.2 Objetivo Específico

- Determinar a expressão de G3BP2 em CE cavidade oral, excluindo os tumores de língua (que daqui para frente será chamado simplesmente de CE de cavidade oral) por PCR em tempo real.
 - Verificar se no câncer de língua e de laringe, a expressão de G3BP2 apresenta o mesmo perfil do observado em cavidade oral;
 - Analisar a expressão dos RNAm de TF e sua isoforma asHTF, utilizando o ensaio de PCR em tempo real, em fragmentos de tumor primário e mucosa adjacente de pacientes com CE de cabeça e pescoço;
 - Correlacionar os dados obtidos da expressão do RNAm das isoformas de TF e de G3BP2 com as características clínico-patológicas;
 - Verificar se o perfil de expressão da proteína de TF e asHTF em tumores de cavidade oral corresponde ao encontrado pela análise do RNAm.
-

3. Casuística e Métodos

3.1. Casuística

Amostras de tumor primário e mucosa adjacente foram obtidas de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidos a ressecção cirúrgica, indicada independente deste trabalho, no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis em São Paulo. As amostras foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e também do Hospital Heliópolis. Todos os pacientes foram informados e esclarecidos dos objetivos deste trabalho e estando em concordância, assinaram o consentimento informado previamente à coleta.

Nossa casuística é formada por 148 pacientes com carcinoma epidermóide, sendo 70 com carcinoma epidermoide de cavidade oral, 35 de língua e 43 de laringe. As características clinico-patologicamente avaliadas estão mostradas na Tabela 1.

Na casuística predomina o sexo masculino com 129 indivíduos e 19 do sexo feminino, todos com idades entre 34 e 87 anos. O seguimento mediano foi de 17,9 meses, sendo que durante o último seguimento realizado em julho de 2007 constatou-se 83 pacientes vivos. O sítio primário mais freqüente em carcinoma oral foi o soalho, encontrado em 40 pacientes; em

câncer de língua foi a borda da língua presente em 25 pacientes e no carcinoma de laringe a prega vocal foi o sítio mais freqüente encontrado em 21 pacientes. Os parâmetros para a determinação do grau de tabagismo e de etilismo para os pacientes com CE de cabeça e pescoço foram realizados pelo Hospital Heliópolis. Vinte pacientes apresentaram grau 0+1 para o tabagismo e 105 pacientes faziam uso de bebida alcoólica em grau 2+3+4 (o grau 0 representa a ausência do uso de tabaco ou da ingestão de bebida alcoólica, do grau 1 ao 4 representa o pouco uso até o uso intenso de tabaco ou da ingestão de bebida alcoólica). Todos os tumores foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos na 5ª edição da Classificação de TNM de tumores malignos do UICC (União internacional contra o câncer).

O estadiamento T para os tumores de cavidade oral (incluindo língua) foi considerado como T1 aqueles tumores menores que 2 cm, T2 entre 2,01-4,0 cm, T3 maiores que 4 cm, T4a aqueles que acometem outro sítio anatômico adjacente e T4b aqueles que acometem sítio extrínseco, ossos, entre outros. Em relação ao linfonodos os caracterizados como pN0 são os sem comprometimento, pN1 são os que apresentam um único linfonodo comprometido com tamanho menores ou iguais a 3 cm, pN2a apresenta acometimento linfonodal único ipsilateral de 3,01-6,0 cm, pN2b apresenta múltiplos linfonodos ipsilateral, todos bilateral menores que 6 cm, pN2c apresenta linfonodo bilateral ou contra lateral menor ou igual a 6,0 cm e pN3 acometimento linfonodal maior que 6,0 cm (Manual de condutas do serviço de oncologia INRAD, 2003).

Nos tumores de laringe, foi considerado como T1 os tumores limitados a um subsítio, com mobilidade das cordas vocais normal, como T2 aqueles que se estendem a outro subsítio ou altera a mobilidade das cordas vocais, como T3 aqueles tumores que fixam as cordas vocais com extensão para espaço paraglótico e erosão limitada na cartilagem tireóide; como T4a os tumores com extensão para outro sítio adjacente e como T4b aqueles com invasão para o espaço intraparavertebral, envolvendo carótida ou mediastino. Em relação ao comprometimento linfonodal, os tumores foram classificados como pN0 quando não havia comprometimento, pN1 quando apresentavam um único linfonodo comprometido com tamanho menores ou iguais a 3,0 cm, pN2a com acometimento linfonodal único ipsilateral menor que 6,0 cm, pN2b com múltiplos linfonodos com tamanhos menores que 6,0 cm, pN2c com linfonodos acometidos bilateralmente ou contralateral menor que 6,0 cm e pN3 acometimento linfonodal maior que 6,0 cm (Manual de condutas do serviço de oncologia INRAD, 2003).

Tabela 1: Características clínicas e patológicas dos 148 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

			Número de pacientes
Características clínicas	Gênero	Masculino	129
		Feminino	19
	Idade Mediana		55 anos (34 - 87 anos)
	Seguimento Mediano		17,9 meses (0,2-67,7 meses)
	Condição atual	Vivo	82
		Morto	65
		Perda de seguimento	1
	Cavidade Oral	Área retromolar	8
		Gengivas	12
		Outros	10
		Soalho	40
	Sítio Primário	Borda de língua	23
		Ventre de língua	2
		Língua	10
	Laringe	Prega vocal	21
		Epiglote	4
		Glote	6
		Outros	8
		Supraglote	4
Características Patológicas	Tabagismo	Grau 0 +1	23
		Grau 2 + 3 +4	125
	Etilismo	Grau 0 +1	44
		Grau 2 + 3 +4	104
	Linfonodo	Comprometido	76
		Não comprometido	72
	Tamanho tumoral	T1+T2	48
		T3+T4	99
		Não Determinado (ND)	1
	Diferenciação celular	CE I	65
		CE II +CE III	81
		ND	2

O grau 1, 2, 3 e 4 referem-se a quantidade de uso do tabaco e de bebida alcoólica. O TNM adotado foi de acordo com os critérios estabelecidos na 5ª edição da Classificação de TNM de tumores malignos do UICC (União internacional contra o câncer) e o último seguimento realizado em julho de 2007.

3.2. **Métodos**

3.2.1. **Extração do RNA total**

O RNA total foi extraído utilizando o reagente *TRIzol*[®] (*Invitrogen Life Technologies*) conforme o protocolo do fabricante que é uma modificação do sugerido por Chomczynski e Sacchi (1987). Aproximadamente 100 mg do tecido congelado em nitrogênio foi colocado no aparelho *termovac* (Telcolab Corporation) e pulverizado.

Na capela, em um microtubo de 2ml foi adicionado o tecido pulverizado em 1,0ml de *TRIzol*[®] e homogeneizado vigorosamente. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos a fim de lisar a membrana celular e foi adicionado 200µl de clorofórmio e submetemos à agitação em vortex por 30 segundos seguido de uma centrifugação de 10 minutos a 12.000g e temperatura de 4°C.

Nesta etapa as amostras continham três fases, com ajuda de uma micropipeta a fase aquosa foi retirada (aproximadamente 600µl) e transferida a um segundo microtubo. A este tubo foi adicionado 600µl de fenol pH 4-5 e clorofórmio com álcool isoamílico numa proporção de 49 partes para 1, respectivamente. As amostras foram submetidas a uma agitação em vortex por 30 segundos seguido de uma incubação por 10 minutos no gelo e uma nova centrifugação de 10 minutos a 12.000g e temperatura de 4°C. Aproximadamente 500µl da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo e foram adicionados 500µl de álcool isopropílico para a precipitação do ácido nucléico (RNA). Após

homogenização, o material foi incubado a uma temperatura de -20°C por pelo menos 16 horas. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000g e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado através de uma única inversão, foi adicionado ao *pellet* 1,0ml de etanol 75% DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato 0,002%) e foi homogeneizado delicadamente. Novamente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000g e temperatura de 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* secado com auxílio do vácuo. Para ressuspender foi utilizado água DEPC.

A avaliação do rendimento da extração foi feita com uma quantificação no espectrofotômetro *Gene-Quantpro* (Amersham Biosciences). Para essa quantificação foi adicionado 1µl da amostra em 69µl de Tris-HCl (pH7,6; 10mM). A determinação da absorbância no comprimento de onda 260nm refere-se a quantidade de ácido nucléico (uma densidade ótica equivale a 40 µg de RNA por ml) e o 280nm que se refere a quantia de proteína. O quociente entre 260/280nm deve estar entre 1,78 e 2,0, para ser considerado com pureza adequada.

Avaliação da qualidade do material extraído foi feita em gel de agarose. Para isso foi usado 1% de agarose em MOPS 1X (2M MOPS, 0,5M de acetato de sódio e 0,1M de EDTA pH 7,0) e 5,1% de formaldeído. As amostras foram preparadas contendo tampão para RNA (53% formamida, 6%, formaldeído, 7% glicerol, 6% azul de bromofenol e 10% de MOPS 10X), 1 µg/mL de gel de brometo de etídio e 0,5µg de RNA extraído. As amostras foram incubadas no banho-maria a 65°C por 15 minutos, em seguida colocadas no gelo por 2 minutos e aplicadas no gel. A corrida da eletroforese

foi realizada em tampão MOPS 1X e a voltagem constante de 50 Volts em temperatura ambiente. Foi considerado de boa qualidade quando a banda 28S se mostrou duas vezes mais intensa que a banda 18S e ausência de arraste na amostra como mostra a Figura 3.

Figura 3: Extração de RNA total. O RNA de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,0%. 1-7: Representação das amostras, onde a banda referente ao RNA ribossômico 28S mostrou-se aproximadamente duas vezes mais intensa que a banda do RNA ribossômico 18S caracterizando, assim, um RNA total de boa qualidade.

3.2.2. Preparação e verificação do cDNA

Em um microtubo de 1,5ml foi colocado 5µg de RNA e diluído em água MiliQ até um volume de 11µl. Após adição de 0,01µg/µl de *random hexâmero*, o material foi incubado em banho-seco por 7 minutos a 65°C e mais uma incubação em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 50mM de Tris-HCl (pH8,3), 75mM de KCl, 3mM de MgCl₂, 0,5mM de dNTP, 10U/µl de *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen)* e 5mM de DTT em um volume final de 20µl.

As amostras foram incubadas em banho-seco por uma hora a 50°C, seguido de incubação por 15 minutos a uma temperatura de 70°C para a inativação da enzima. As amostras foram diluídas para uma concentração final de aproximadamente 25ng/μl em água MiliQ e armazenadas a uma temperatura de -20°C.

Para verificar se a reação de cDNA foi realizada, uma PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para um gene normalizador (no caso a β -actina) foi feita. O ensaio foi realizado a partir de 150nM do oligonucleotídeos senso e anti-senso (Tabela 2), 200nM de dNTP, 5mM de MgCl₂, 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 1U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 25ng do cDNA em um volume final de 20μl. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, hibridização a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os oligonucleotídeos usados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). A sequência genômica usada foi a NM_001101 (NCBI) e os oligonucleotídeos desenhados encontram-se entre o exon 3 e exon 4 e amplificam um produto de 188 pares de base (pb).

Tabela 2: Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR da β -actina.

oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do produto
Senso	5'-AGAAATCTGGCACCACACC-3'	188 pares de bases
Anti-senso	5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'	

O produto total desta reação de PCR foi aplicado num gel de agarose com 2µl do tampão para DNA (xileno cianol 10X). Este gel continha 1,5% de agarose e tampão TBE 1X (Tris-base 0,08 %, ácido bórico 0,55 % e EDTA 0,1 M, pH 8,0) e solução de Brometo de Etídio (50ng/ml). Foi usado também 2µl do peso molecular de 100pb como padrão de corrida, somado a 1µl do tampão para DNA em um volume de 10µl. A eletroforese foi realizada com 60Volts e em tampão de TBE 1X.

3.2.3. PCR em tempo real

O método da PCR em tempo real com a utilização do fluoróforo *SYBR[®] Green* foi usado para determinar a expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF. Essa metodologia baseia-se na intercalação do *SYBR[®] Green* na dupla fita de DNA e no monitoramento da fluorescência emitida em cada ciclo da amplificação. Entretanto, o fluoróforo pode ligar-se a qualquer dupla fita formada durante a reação incluindo dímeros de oligonucleotídeos (Ririe et al., 1997). Portanto, a especificidade da reação é verificada através de uma curva de desnaturação que eleva a temperatura até que ocorra a desnaturação completa do produto da PCR, onde um único pico de fluorescência é indicativo de uma reação específica.

Nas reações foi usado 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 200µM de dNTP; 5% de DMSO (Dimetil sulfoxide); 100nM dos oligonucleotídeos senso e anti-senso para G3BP2 e 200nM para TF e asHTF (Tabela 3); 1,5mM de MgCl₂; 1,5x de *SYBR Green*; 1,5U de

Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 50ng do cDNA em um volume final de 20µl. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, hibridização a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto. A curva de desnaturação foi realizada variando a temperatura no intervalo de 72°C a 99°C, sendo 1°C por etapa.

Tabela 3: Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos		Sequência	Tamanho do produto
G3BP2	Senso	5'-CTTTCTCCTGGGCTTCAGTG-3'	186 pb
	Anti-senso	5'-TAGGAGGAAAACCAGGTCGT-3'	
TF	Senso	5'-CCGAACAGTTAACCGGAAGA-3'	168 pb
	Anti-senso	5'- CCCACTCCTGCCTTTCTACA-3'	
asHTF	Senso	5'-GGAAAGAAATATTCTACATCATTGGA-3'	103 pb
	Anti-senso	5'- CCCACTCCTGCCTTTCTACA-3'	

Para o gene G3BP2 os oligonucleotídeos amplificaram um produto de 186pb estando entre o exon 8 e exon 9 da sequência genômica NM_012297. Para diferenciar as duas isoformas do gene TF foi desenhado dois pares oligonucleotídeos partindo da sequência genômica NM_001993. O primeiro par, correspondente a isoforma asHTF, o oligonucleotídeo senso estava entre o exon 4 e o exon 6 e o anti-senso em outra região do exon 6. O segundo par de oligonucleotídeos, correspondente ao TF, tem oligonucleotídeo senso no exon 5 e o oligonucleotídeo anti-senso no exon 6.

Os ensaios foram realizados em duplicata e foi aceito uma variação entre a duplicata menor que 1,0 no seu C_t (ciclo do *Threshold*), de acordo com as instruções do fabricante do aparelho *Rotor-Gene RG3000* (Corbett

Research). A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação a média da expressão dos genes sugeridos como os mais estáveis pelo *Genorm*. Além disso, em todos os ensaios havia uma mesma amostra chamada de amostra referência e um controle negativo no qual não continha cDNA.

O resultado da PCR em tempo real foi analisada com auxílio do programa *Rotor-Gene 6* versão 6.0 (*Corbett Research*). Os resultados obtidos foram normalizados através do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (amostra referência); $\Delta C_T = \text{Média do gene alvo} - \text{Média dos genes normalizadores}$.

3.2.4. Seleção dos genes Normalizadores

Quando o PCR em tempo real é analisado, muitos parâmetros precisam ser controlados para obter valores de expressão relativa fidedigno. Isto inclui as variações na quantidade inicial da amostra, integridade do RNA, eficiência da síntese de cDNA e diferenças na atividade transcricional global de cada tecido ou célula analisada. Além disso, a seleção de um gene que possa ser usado como controle interno para a normalização da expressão é de suma importância. Para esse gene ser validado como gene de controle interno, sua expressão não deve variar em tecidos ou células. Infelizmente, até o presente momento nenhum gene foi encontrado com esta característica e muitos pesquisadores questionam se esse tal gene realmente existe (Andersen et al., 2004). Alguns grupos buscam formas de

minimizar esse problema determinando grupos de genes mais estáveis entre eles que possam caracterizar um controle interno.

A determinação dos genes normalizadores mais estáveis foi realizado através do método estabelecido por Vandesompele et al. (2002) chamado *Genorm*. Este método baseia-se nos valores M de cada gene. Esse valor M é a média da variação pareada de um determinado gene em relação a todos os outros genes. Foram escolhidos onze genes como possíveis candidatos a genes normalizadores de acordo com a literatura (Tabela 4).

Tabela 4: Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR em tempo real para a escolha dos normalizadores.

Oligonucleotídeos		Sequência	Tamanho do produto	Referência bibliográfica
β-actina	Senso	5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'	188pb	Laboratório de oncologia Pombo-Suarez et al., 2008
	Anti-senso	5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'		
B2M	Senso	5'-ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA-3'	101pb	Paik et al., 2004
	Anti-senso	5'-GGCATCTTCAAACCTCCATG-3'		
GUSB	Senso	5'-CCTGGTTTTATTGGCAATCT-3'	160pb	Steckelbroeck et al., 2002
	Anti-senso	5'-GGTTGGAGAGCTCATTTGGA-3'		
HMBS	Senso	5'-ACCAAGGAGCTTGAACATGC-3'	145pb	Erovic et al., 2003
	Anti-senso	5'-GAAAGACAACAGCATCATGAG-3'		
HPRT1	Senso	5'-GCCAGACTTTGTTGGATTTG-3'	141pb	Murphy et al., 2003
	Anti-senso	5'-CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG-3'		
PPIA	Senso	5'-CCCACCGTGTTCTTCGACAT-3'	116pb	Paik et al., 2004
	Anti-senso	5'-CCAGTGCTCAGAGCACGAAA-3'		
RPLP0	Senso	5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'	149pb	Girault et al., 2003
	Anti-senso	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'		
TBP	Senso	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	132pb	Andersen et al., 2004
	Anti-senso	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'		
18S	Senso	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'	65pb	Paik et al., 2004
	Anti-senso	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'		
TUBA6	Senso	5'-GCAGACCCCTTCAAGTTCTAGTCA-3'	95pb	
	Anti-senso	5'-GTAGAGCTCCCAGCAGGCATT-3'		
TFRC	Senso	5'-GCACCGTTATTTTGTTCACGC-3'	150pb	
	Anti-senso	5'-TGATCGTGTTCATGAGAGTGGA-3'		

A β-actina é uma proteína altamente conservada que está envolvida na motilidade celular, estrutura, integridade e é o componente mais

importante do aparato contrátil, porém não participa da contração muscular. A B2M, Beta-2-microglobulina, é uma proteína encontrada em fortemente associada a cadeia do Complexo maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe I. Esta proteína está presente na superfície de quase todas as células nucleadas. O GUSB, beta-glucuronidase, é uma proteína hidrolase lisossomal envolvida no passo da degradação das glicosaminoglicanas contendo ácido glucurônico. HMBS, Hidroximetilbilano sintase, é a terceira enzima da via da biosíntese do grupo heme e cataliza toda a condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio na forma linear do hidroximetilbilano. HPRT1 catalisa a conversão dos hipoxantina a inosina monofosfato e da guanina para guanosina monofosfato via transferência do grupo 5-fosforibosil para 5-fosforibosil 1-pirofosfato. PPIA, Peptidil-prolil isomerase A, cataliza a isomerização cis-trans de peptídeos entre prolinas em oligopeptídeos e acelera a dobradura das proteínas. RPLP0, proteína ribossomal grande P0, compõe a subunidade 60S do ribossomo e apresenta propriedades ácidas ao contrário da maioria das outras proteínas ribossomais. TBP, proteína ligada à região TATA, pode participar na transcrição basal, servir como coativador, funcionar como promotor de reconhecimento ou modificar os fatores de transcrição gerais (GTFs) para facilitar a montagem complexa e iniciar a transcrição. 18S, é a sequência que codifica o RNA ribossomal que está presente como unidades de repetição rDNA na região p12 dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22, designados RNR1 até RNR5. Cada unidade de repetição rDNA consiste de números variados de genes 5.8S, 18S e 28S. TUBA6, alfa tubulina 1c. As

tubulinas são os maiores componentes dos microtubulos. Heterodímero de alfa e beta tubulina é uma subunidade estrutural dos microtubulos. TFRC, receptor de transferrina, participa no transporte de ferro para a célula (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>).

Nas reações de PCR em tempo real foi usado 20mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM de KCl, 200 μ M de dNTP; 5% de DMSO (Dimetil sulfoxide); de 100 a 200 η M dos oligonucleotídeos senso e anti-senso para cada gene; 1,5 a 2,5mM de MgCl₂ (Tabela 4); 1,5x de *SYBR Green*; 1,5U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 0,5 a 50 η g do cDNA em um volume final de 20 μ l. As amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, hibridização com temperatura e tempo variado de acordo com cada gene (Tabela 5), extensão a 72°C por 30 segundos. A curva de desnaturação foi realizada variando a temperatura no intervalo de 72°C a 99°C, sendo 1°C por etapa.

Tabela 5: Temperaturas da PCR em tempo real, concentração dos oligonucleotídeos e concentração de $MgCl_2$ padronizados para os candidatos a genes normalizadores

Genes	Temperatura de anelamento	[] oligonucleotídeos	[] $MgCl_2$
β -actina	60°C 60 segundos	100 η M	1,5mM
B2M	56°C 30 segundos	100 η M	2,5mM
GUSB	60°C 60 segundos	200 η M	2,0mM
HMBS	60°C 60 segundos	200 η M	2,0mM
HPRT1	60°C 60 segundos	200 η M	2,0mM
PPIA	65°C 60 segundos	200 η M	2,0mM
RPLP0	60°C 60 segundos	200 η M	2,0mM
TBP	60°C 60 segundos	200 η M	1,5mM
18S	55°C 40segundos	200 η M	2,0mM
TUBA6	60°C 60 segundos	200 η M	1,5mM
TFRC	60°C 60 segundos	200 η M	2,0mM

Na realização do *Genorm* foram selecionadas vinte amostras aleatórias em cada sítio para a escolha dos genes mais estáveis. Na cavidade oral (excluindo os tumores de língua) os genes escolhidos como mais estáveis foram RPLP0, HPRT1, HMBS, TBP, PPIA, 18S (Figura 4A). Na língua os escolhidos foram HMBS, TBP, HPRT1, PPIA, RPLP0, GUS (Figura 4B). Na laringe os mais estáveis foram HMBS, TBP, PPIA, HPRT1, β -actina, 18S (Figura 4C).

Figura 4: Gráficos calculados pelo programa Genorm para os genes mais estáveis. No gráfico A estão os genes mais estáveis para a cavidade oral (excluindo língua), No gráfico B estão os genes mais estáveis para a língua e no gráfico C os genes mais estáveis para os tumores de laringe. Na cavidade oral (excluindo os tumores de língua) os genes escolhidos como mais estáveis foram RPLP0, HPRT1, HMBS. Na língua os escolhidos foram HMBS, TBP, HPRT1. Na laringe os mais estáveis foram HMBS, TBP, PPIA, HPRT1.

3.2.5. Extratos Protéicos

Os tumores primários foram pulverizados em 1 ml de Tampão de Lise (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7.4) com auxílio do aparelho Polytron, contendo 1% do *Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA) e orthovanadato de sódio (NaVO_3). O lisado foi então incubado por 15 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante formado foi transferido para um novo microtubo. Os extratos foram mantidos a temperatura de -20°C.

3.2.6. Dosagem Protéica

A concentração protéica dos extratos foi determinada com Kit de Ensaio de Proteína BCA (Bio Agency) que é um método de Lowry Modificado. Com uma coloração inicial esverdeada, o reagente BCA muda de cor devido a redução do cobre ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) na presença de proteínas em meio alcalino, passando a apresentar uma coloração púrpura resultante da interação de duas moléculas do reagente BCA (ácido bicincôninico) com um íon de cobre (Cu^{1+}). Este complexo solúvel em água exibe uma alta absorbância à 562nm com resultados aproximadamente lineares, permitindo a quantificação de proteínas na faixa de 20 - 2.000µg/ml quando medidas em um espectrofotômetro ou leitor de placas.

Em uma placa de 96 poços, foi realizado uma curva padrão de BSA (0 – 5mg), também foram colocados 4 µl de cada amostra a ser quantificada, em triplicata, juntamente com 70 µl dos reagentes A e B na proporção de

50:1. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura de 37°C. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm (Bio Rad Model 550, Microplate reader) e a quantidade de proteína que cada amostra continha foi determinada através da comparação com a absorbância da curva padrão de BSA.

3.2.7. Western Blotting

Trinta µg de cada amostra foi separada por eletroforese em gel 12% de poliacrilamida-SDS em condições não redutoras. O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375M pH 8.8, SDS 0.1%, Acrilamida 12%, persulfato de amônio (APS) 0.03% e N,N,N,N tetra metiletilenodiamina (TEMED, Sigma). Além disso, o gel de empilhamento foi preparado com Tris 0,125M pH 6.8, SDS 0,1%, Acrilamida 4%, APS 0,045% e TEMED. Os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra não redutor (Tris-HCL 240 mM pH 6.8, SDS 0,8%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%), incubados a 100°C por 5 minutos e aplicados imediatamente no gel de poliacrilamida-SDS. A eletroforese foi feita em tampão Tris 25mM, Glicina 0,19 M pH 8.3, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 60V.

Os extratos protéicos separados em gel 12% de poliacrilamida-SDS foram eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (Hydrophobic Polyvinylidene Difloride, Amersham). A membrana foi ativada em metanol seguido de uma rápida passada em água. O aparato foi montado para a transferir as proteínas que estão no gel para a membrana e a transferência foi

realizada em tampão Tris 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20% por 1 hora a 100V a 4°C.

Após a transferência a membrana foi ativada novamente em metanol. Em seguida, membrana foi incubada em tampão de leite desnatado 5% em PBS por pelo menos 1 hora a temperatura ambiente sob agitação a fim de bloquear as possíveis ligações não específicas. Depois a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico para o TF humano (American Diagnostic Inc.) diluído 1:1000 ou a β -actina (SIGMA) diluído 1:2000.

A membrana foi lavada com PBS/leite desnatado 5% por 3 vezes durante 20 minutos. Em seguida, foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (HRP – Horseradish Peroxidase Conjugate, KPL – Kirkegard & Perry Laboratories, Maryland, USA) 1:1000 diluído em PBS/leite desnatado 5% por 1 hora a temperatura ambiente, o qual foi visualizado pelo sistema de detecção ECL (Amersham Pharmacia Biotech) como descrito pelo fabricante.

3.2.8. Análise estatística

Os valores de expressão dos marcadores analisados, normalizados em relação ao gene da β -actina e amostra referência, foram submetidos a análise estatística com auxílio do programa SPSS versão 15.0. Nas comparações entre o tecido tumoral e a mucosa adjacente foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Para comparação da expressão dos marcadores

biológicos em relação aos dados clínico-patológicos utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As curvas de sobrevida foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e foram comparadas pelo teste de Log-Rank. Os fatores que apresentarem significância estatística pela análise univariada foram também analisados pela análise multivariada de Cox. Foram considerados indicativos de significância estatística os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Expressão de G3BP2, TF e asHTF em CE de cavidade oral.

Inicialmente comparamos a expressão relativa dos genes alvo no tumor com a expressão relativa na mucosa adjacente. Desta forma, foi possível observar que a expressão relativa do RNAm de G3BP2 foi menor no tumor primário (Média: $0,13 \pm 0,20$ Desvio Padrão) em relação a mucosa adjacente ($0,39 \pm 0,79$, $n=40$ e $P=0,004$ – Teste Pareado de Wilcoxon). Para o TF e asHTF não foi encontrado diferença de expressão entre o tumor primário (TF: $0,14 \pm 0,17$; asHTF: $0,12 \pm 0,15$) e a mucosa adjacente (TF: $0,20 \pm 0,22$, $n=40$ e $P=0,239$; asHTF: $0,17 \pm 0,20$, $n=40$ e $P=0,133$; Figura 5).

Figura 5: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF no tumor primário e mucosa adjacente em carcinoma epidermoide de cavidade oral. Os genes G3BP2, TF asHTF foram estudados em 40 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral. Caixas: 25%, 50%, 75%; barras: 10% e 90%; °: representa valores de 1,5 a $-3x$ do quartil superior; *: representa valores acima de $3x$ do quartil superior. Houve uma diminuição na expressão do RNAm de G3BP2 no tecido tumoral ($P=0,004$ – teste de Wilcoxon pareado). Para o RNAm de TF e asHTF não encontramos diferenças significativas ($P=0,239$ e $P=0,133$, respectivamente).

Em seguida foram analisados os valores de expressão relativa do tumor primário com os dados clínicos. Em relação à idade dos pacientes, a mediana calculada para o grupo de CE de cavidade oral que foi de 52 anos. Os pacientes que apresentaram idade acima da mediana do grupo foi novamente subdividido pela mediana, onde neste caso foi de 60 anos. O mesmo aconteceu para os pacientes que apresentaram idade menor que 52, eles foram novamente subdivididos pela mediana que nesta situação foi de 46 anos. Assim foi formando quatro grupos (menores que 46 anos, entre 46 e 52 anos, entre 52 e 60 anos e maiores que 60 anos). Não foi encontrada nenhuma diferença estatística para os três genes em relação à idade

mediana (G3BP2: $P=0,239$; TF: $P=0,665$; asHTF: $P=0,820$ – Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; Tabela 6). Além disso, esses pacientes também foram divididos pela idade que geralmente é diagnosticado este tipo de câncer, aos 60 anos. Assim, não foi observada nenhuma diferença estatística quando foi comparado os pacientes com idade superior a 60 anos em relação aos de idade inferior de 60 anos para os três genes estudados (G3BP2: $P=0,538$; TF: $P=0,180$; asHTF: $P=0,374$ – Teste não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 6).

Em relação aos demais dados clínicos, não foram encontrados diferenças significativas para os três genes quando levado em consideração o sexo, o grau de tabagismo e o grau de etilismo (G3BP2: $P=0,973$, $P=0,859$, $P=0,962$; TF: $P=0,821$, $P=0,342$, $P=0,124$; asHTF: $P=0,750$, $P=0,425$, $P=0,151$, respectivamente – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 6).

Tabela 6: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral (excluindo língua): em relação as características clínicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Idade Mediana*						
>60 anos (16)	0,17±0,20	0,239	0,09±0,11	0,665	0,11±0,13	0,820
Entre 52 e 60 anos (18)	0,18±0,29		0,14±0,18		0,14±0,19	
Entre 46 e 52 anos (18)	0,18±0,36		0,82±2,89		0,48±1,59	
≤46anos (16)	0,11±0,15		0,13±0,14		0,11±0,12	
Idade*						
>60anos (16)	0,17±0,28	0,538	0,09±0,11	0,180	0,11±0,13	0,374
≤60anos (52)	0,16±0,20		0,37±1,71		0,25±0,94	
Sexo**						
Feminino (11)	0,11±0,10	0,973	0,11±0,12	0,821	0,11±0,12	0,750
Masculino (57)	0,17±0,28		0,35±1,63		0,24±0,90	
Tabagismo*						
Grau 0+1 (15)	0,22±0,41	0,859	0,90±3,17	0,342	0,54±1,74	0,425
Grau 2+3+4 (53)	0,14±0,20		0,14±0,17		0,12±0,16	
Etilismo*						
Grau 0+1 (20)	0,21±0,37	0,962	0,70±2,75	0,124	0,42±1,51	0,151
Grau 2+3+4 (48)	0,14±0,20		0,14±0,17		0,13±0,16	

*P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. **P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Os valores de expressão relativa do tumor primário também foram comparados aos dados patológicos e não foram encontradas diferenças significativas para o gene G3BP2 quando foi levado em consideração o status linfonodal, o tamanho do tumor e diferenciação celular ($P=0,640$; $P=0,296$; $P=0,138$, respectivamente; Tabela 7). Já para o gene TF, foi observado uma tendência no aumento da expressão no grupo de tumores primário provenientes de pacientes pN+ ($0,49 \pm 2,04$, $n=36$) em relação ao grupo pN0 ($0,10 \pm 0,18$, $n=32$ e $P=0,003$ – teste não paramétrico de Mann-Whitney). Em relação ao grau histológico foi observada uma tendência de maior expressão de TF nos tumores moderado/pouco diferenciados (CE II+III: $0,53 \pm 2,13$, $n=33$, $P=0,073$ - teste de não paramétrico de Mann-

Whitney) quando comparados aos bem diferenciados (CE I: $0,10 \pm 0,14$, $n=34$), mas sem diferença estatística. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre tumores menores (pT1+pT2) comparados àqueles com tamanhos maiores (pT3+pT4; $P=0,413$; Tabela 7). Em relação ao gene asHTF foi observado uma maior expressão no grupo de tumores primário provenientes de pacientes pN+ ($0,33 \pm 1,12$, $n=38$) em relação ao grupo pN0 ($0,08 \pm 0,14$, $n=32$ e $P=0,004$ – teste de não paramétrico de Mann-Whitney). Entretanto, quando foi levado em consideração o tamanho do tumor e diferenciação celular, não foram observadas diferenças significativas ($P=0,329$; $P=0,136$, respectivamente; Tabela 7).

Tabela 7: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral (excluindo língua): em relação as características patológicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Linfonodo						
pN0 (32)	0,11±0,12	0,640	0,10±0,18	0,003	0,08±0,14	0,004
pN+ (36)	0,20±0,34		0,49±2,04		0,33±1,12	
Tamanho Tumoral						
pT1+T2 (30)	0,22±0,35	0,296	0,50±2,25	0,413	0,31±1,23	0,329
pT3+T4 (38)	0,12±0,16		0,15±0,19		0,14±0,18	
Diferenciação Celular						
CE I (34)	0,22±0,41	0,138	0,10±0,14	0,073	0,09±0,13	0,136
CEII+III (33)	0,14±0,20		0,53±2,13		0,35±1,17	

P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney.
 pN0 = Linfonodo não comprometido, pN+ = linfonodo comprometido; CE I = carcinoma epidermóide bem diferenciado, CE II+III = carcinoma epidermóide moderado/pouco diferenciado, respectivamente.

Além destas análises, foi investigado se a expressão relativa do tumor primário de G3BP2 estava relacionada à de TF e de sua isoforma asHTF, utilizando a correlação de Pearson. Foi observado uma correlação direta

entre a expressão de G3BP2 e a expressão de TF ($r=0,678$; $P<0,001$), assim como foi observado na expressão de G3BP2 e relação a expressão de asHTF ($r=0,672$; $P<0,001$). Entre a expressão de TF e da sua isoforma asHTF foi observado uma correlação direta ($r=0,995$; $P<0,001$).

As curvas de sobrevida global e livre de doença foram realizadas através do método de Kaplan-Meier. A realização das curvas dos genes estudados foi baseada na expressão relativa tumoral, onde os tumores foram caracterizados como positivos (expressão maior que a mediana) ou negativos (expressão menor ou igual que a mediana). Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa quando a sobrevida global e livre de doença foi analisada em relação à expressão de G3BP2 ($P=0,904$; $P=0,782$ - respectivamente; Figura 6A e B). Foi observado que os pacientes com tumores positivos (+) para o gene TF apresentaram pior sobrevida quando comparados aos pacientes com expressão negativa (-). Porém a diferença estatística foi encontrada apenas na sobrevida livre de doença (TF+: 8,13 meses; TF-: 29,9 meses; $P=0,034$; Figura 6D). O mesmo perfil de expressão, onde pacientes (+) apresentaram pior sobrevida em relação aos (-) foi observado para o gene asHTF na sobrevida livre de doença (asHTF+: 8,1 meses; asHTF-: 29,9 meses; $P=0,010$; Figura 6F).

Figura 6: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F). Os pacientes foram classificados em positivos (acima) ou negativos (igual ou abaixo) de acordo com a mediana da expressão no tumor primário dos genes analisados. Os pacientes com tumores TF positivos apresentaram pior sobrevida livre de doença ($P=0,034$, respectivamente – teste de Log Rank). O asHTF também manteve o mesmo comportamento onde os pacientes com tumores asHTF positivos apresentaram pior sobrevida livre de doença ($P=0,010$). Para o gene G3BP2 não foi observado nenhuma correlação da expressão gene com a sobrevida dos pacientes. N= nº de pacientes.

Não foi observadas significância estatística em relação à idade mediana e a sobrevida global dos pacientes ($P=0,157$ – Teste de Log-rank; Figura 7A). Em relação à sobrevida livre de doença foi observada uma melhor sobrevida nos pacientes com idade entre 52 e 46 anos (Mediana não atingida) quando comparados com aos pacientes com idade maior que 60 anos (9,2 meses), menor que 46 anos (13,3 meses) e entre 60 e 52 anos (20,6 meses; $P=0,034$; Figura 7B). Não foi observada nenhuma relação da sobrevida global e da livre de doença dos pacientes em relação ao grau de tabagismo ($P=0,921$, $P=0,415$ – respectivamente; Figura 7C e D), grau de etilismo ($P=0,706$, $P=0,475$ – respectivamente; Figura 7E e F) e sexo feminino ou masculino ($P=0,096$, $P=0,086$ – respectivamente; Figura 7G e H).

Figura 7: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H). Os pacientes foram classificados como >60 anos, entre 52 e 60 anos, entre 46 e 52 anos e ≤46 anos, ou de acordo com o grau de tabagismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o grau de etilismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o sexo dos pacientes. Os pacientes com idade entre 52 e 46 anos melhor sobrevida livre de doença ($P=0,034$) quando comparado aos demais grupos. As demais características não apresentaram diferenças estatísticas. N= nº de pacientes.

Os pacientes pN0 apresentaram uma tendência de maior sobrevida global (pN0: 29,9 meses, pN+: 13,3 meses; $P=0,053$; Figura 8A), porém sem significância estatística e não foi observada significância estatística para a sobrevida livre de doença ($P=0,113$; Figura 8B). O tamanho tumoral não apresentou correlação com a sobrevida global e livre de doença desses pacientes ($P=0,697$, $P=0,387$ - respectivamente; Figura 8C e D). O grau histológico se mostrou importante apenas na sobrevida livre de doença, onde os tumores classificados como bem diferenciado (CE I) apresentaram melhor sobrevida comparados ao grupo moderado/pouco diferenciados (CE I: 29,5 meses, CE II+III: 9,6 meses; $P=0,038$; Figura 8F).

Figura 8: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F). Os pacientes foram de acordo com o comprometimento linfonodal: em pN0 (sem) ou pN+ (com linfonodo comprometido), ou de acordo com o tamanho do tumor primário: os de menor tamanho (pT1+T2) ou maior tamanho (pT3+T4), ou de acordo com o grau de diferenciação: bem diferenciado (CE I) moderado/pouco diferenciado (CE II+III). O grupo de pacientes pN+ apresentaram pior sobrevida global ($P=0,053$), porém sem diferença estatística. Os tumores de maior tamanho não apresentaram diferença estatística em relação aos tumores de menores tamanhos tanto na sobrevida global do paciente como na livre de doença ($P=0,697$, $P=0,387$ – respectivamente). Os tumores classificados como moderado/pouco diferenciados apresentaram uma pior sobrevida livre de doença ($P=0,036$), porém nenhuma correlação foi observada na sobrevida global ($P=0,570$). N= nº de pacientes.

Na análise multivariada de COX foram incluídos todos os fatores que apresentaram resultado significativo na análise de Log-Rank. Assim, considerando a sobrevida livre de doença, os genes TF e asHTF apresentam significância estatística ($P=0,002$; $P=0,002$, respectivamente; Tabela 8) e o risco de morte foi de 0,056 para tumores com maior expressão de TF e de 219,48 vezes maior para tumores com maior expressão de asHTF.

Tabela 8: Regressão de COX para a sobrevida livre de doença dos fatores: tamanho do tumor, grau de diferenciação celular, comprometimento ou não dos linfonodos, expressão de G3BP2, TF e da sua isoforma asHTF em pacientes com CE de cavidade oral (excluindo língua).

	Significância	Exp (B)	95% CI para Exp (B)	
			abaixo	acima
Idade	0,329	1,019	0,981	1,058
Grau Histológico	0,185	0,588	0,268	1,290
Expressão de TF	0,002	0,056	0,009	0,360
Expressão de asHTF	0,002	219,48	7,317	6583,724

Os resultados obtidos da expressão do RNAm para asHTF e TF foi confirmado pelo ensaio de Western Blotting em 17 tumores primários. Este ensaio mostrou que 76,4% dos casos a proteína de TF apresentou o mesmo padrão de expressão (tumores que apresentavam aumento da expressão do RNAm coincidiu com o aumento da expressão da proteína de TF) assim como a proteína de asHTF apresentou 58,8% de coincidência.

4.2. Expressão de G3BP2, TF e asHTF para CE de língua.

A análise feita em 35 carcinomas de língua indicou expressão do RNAm de G3BP2 menor no tumor primário ($12,36 \pm 27,73$) em relação à mucosa adjacente ($38,13 \pm 55,51$, $n=20$ e $P=0,014$ – teste de Wilcoxon pareado). Assim como na cavidade oral, os genes TF e asHTF não apresentaram diferença estatística entre tumor primário (TF: $11,29 \pm 111,44$; asHTF: $13,50 \pm 16,04$) e a mucosa adjacente (TF: $20,70 \pm 28,68$, $n=20$ e $P=0,455$; asHTF: $24,77 \pm 37,33$, $n=20$ e $P=0,411$ – teste de Wilcoxon pareado; Figura 9).

Figura 9: Comparação dos dados da expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF entre tecido de tumor primário e mucosa adjacente provenientes dos pacientes com CE de língua. Caixas: 25%, 50%, 75%; barras: 10% e 90%; °: representa valores de 1,5 a $-3x$ do quartil superior; *: representa valores acima de $3x$ do quartil superior. Houve uma diminuição na expressão do RNAm de G3BP2 no tecido tumoral ($P=0,014$ – teste de Wilcoxon pareado). O RNAm de TF e asHTF não apresentaram diferenças significativas ($P=0,455$ e $P=0,411$, respectivamente).

Em seguida foram analisados os valores de expressão relativa do tumor primário com os dados clínicos. Em relação à idade dos pacientes, a

mediana calculada para o grupo de CE de língua que foi de 54 anos. Os pacientes que apresentaram idade acima da mediana do grupo foi novamente subdividido pela mediana, onde neste caso foi de 60 anos. O mesmo aconteceu para os pacientes que apresentaram idade menor que 54, eles foram novamente subdivididos pela mediana que nesta situação foi de 46 anos. Assim foi formando quatro grupos (menores que 46 anos, entre 46 e 54 anos, entre 54 e 60 anos e maiores que 60 anos). Não foi encontrada nenhuma diferença estatística para os três genes em relação à idade mediana (G3BP2: $P=0,317$; TF: $P=0,403$; asHTF: $P=0,515$ – Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; Tabela 9). Além disso, esses pacientes também foram divididos pela idade que geralmente é diagnosticado este tipo de câncer, aos 60 anos. Assim, não foi observada nenhuma diferença estatística quando foram comparados os pacientes com idade superior a 60 anos em relação aos de idade inferior de 60 anos para os três genes estudados (G3BP2: $P=0,237$; TF: $P=0,640$; asHTF: $P=0,746$ – Teste não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 9).

Em relação aos demais dados clínicos, não foram encontrados diferenças significativas para os três genes quando levado em consideração o sexo, o grau de tabagismo e o grau de etilismo (G3BP2: $P=0,172$, $P=0,429$, $P=0,151$; TF: $P=0,944$, $P=0,726$, $P=0,245$; asHTF: $P=0,813$, $P=0,920$, $P=0,353$, respectivamente – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 9).

Tabela 9: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de língua: em relação as características clínicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Idade Mediana*						
>60 anos (7)	6,87±14,3	0,317	7,95±7,13	0,403	0,11±0,13	0,515
Entre 52 e 60 anos (7)	3,31±4,41		8,04±9,73		0,14±0,19	
Entre 46 e 52 anos (6)	6,59±9,13		10,31±13,83		0,48±1,59	
≤46anos (9)	17,03±39,79		14,71±11,55		0,11±0,12	
Idade*						
>60anos (7)	6,87±14,33	0,237	7,95±7,14	0,640	16,25±20,24	0,746
≤60anos (22)	9,82±25,84		11,55±11,55		9,94±11,52	
Sexo**						
Feminino (3)	47,12±65,54	0,172	9,98±9,57	0,944	10,65±9,82	0,813
Masculino (26)	4,72±8,67		10,73±10,92		11,56±14,51	
Tabagismo*						
Grau 0+1 (3)	41,99±69,48	0,429	11,80±9,92	0,726	10,01±10,4	0,920
Grau 2+3+4 (26)	5,31±9,01		10,51±10,88		11,63±14,47	
Etilismo*						
Grau 0+1 (10)	15,10±37,98	0,151	13,45±11,25	0,245	12,67±12,53	0,353
Grau 2+3+4 (19)	5,95±9,92		9,09±10,24		10,83±14,95	

*P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. **P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Os valores de expressão relativa no tumor primário também foram comparados com os dados patológicos e não foram encontradas diferenças significativas para G3BP2 em relação o status linfonodal, tamanho tumoral e grau histológico ($P=0,112$; $P=0,527$; $P=0,914$ – teste não paramétrico de Mann-Whitney, respectivamente; Tabela 10).

Em relação ao tamanho tumoral e o grau histológico, a expressão de TF e de sua isoforma asHTF não apresentaram correlação com essas características (TF: $P=0,121$; $P=0,371$; asHTF: $P=0,283$; $P=0,914$ respectivamente; Tabela 10). Entretanto, esses dois genes apresentaram uma correlação com o comprometimento linfonodal onde uma maior expressão desses genes foi observada nos pacientes com pN+ (TF: $15,20 \pm 12,61$, $n=13$; asHTF: $16,53 \pm 16,95$, $n=14$) em relação aos pacientes pN0

(TF: $6,70 \pm 8,58$, $n=15$, $P=0,033$; asHTF: $6,74 \pm 8,57$, $n=15$, $P=0,018$ – teste de não paramétrico de Mann-Whitney).

Tabela 10: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de língua: em relação as características patológicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Linfonodo						
pN0 (15)	12,17±31,96	0,112	6,70±6,72	0,033	6,74±8,58	0,018
pN+ (14)	5,81±7,39		15,2±12,61		16,53±16,95	
Tamanho Tumoral						
pT1+T2 (12)	13,32±34,61	0,527	14,71±12,76	0,121	13,60±13,25	0,283
pT3+T4 (17)	6,13±10,50		7,60±7,77		9,96±14,65	
Diferenciação Celular						
CE I (16)	9,69±30,03	0,914	12,19±11,27	0,371	10,27±10,18	0,914
CEII+III (13)	8,38±12,14		8,59±9,77		12,93±17,92	

P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney. pN0 = Linfonodo não comprometido, pN+ = linfonodo comprometido; CE I = carcinoma epidermóide bem diferenciado, CE II+III = carcinoma epidermóide moderado/pouco diferenciado, respectivamente.

Aqui também foi investigado se a expressão relativa do tumor primário de G3BP2 estava relacionado com a de TF e de sua isoforma asHTF, utilizando a correlação de Pearson e não observamos nenhuma correlação entre a expressão de G3BP2 com a expressão de TF ($P=0,325$) assim como, com a expressão de asHTF ($P=0,362$). Entre TF e sua isoforma asHTF foi observado uma correlação direta ($r=0,686$; $P<0,001$).

A realização das curvas dos genes estudados foi baseada na expressão relativa tumoral, conforme foi explicado no item 4.1. Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa quando a sobrevida global e livre de doença foi analisada em relação à expressão de G3BP2 ($P=0,988$; $P=0,555$, respectivamente – Teste de Log-rank; Figura 10A e B),

TF ($P=0,650$; $P=0,770$, respectivamente; Figura 10C e D) e asHTF ($P=0,307$; $P=0,702$, respectivamente; Figura 10E e F).

Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F). Os pacientes foram classificados em positivos (acima) ou negativos (igual ou abaixo) de acordo com a mediana da expressão no tumor primário dos genes analisados. Nenhum dos três RNAm analisado mostrou correlação com a sobrevida global e livre de doença dos pacientes. N= nº de pacientes.

Não foi observada nenhuma relação da sobrevida global e da livre de doença dos pacientes em relação a idade mediana ($P=0,310$; $P=0,107$, respectivamente; Figura 11A e B), ao grau de tabagismo ($P=0,604$, $P=0,523$

– respectivamente; Figura 11C e D), grau de etilismo ($P=0,111$, $P=0,653$ – respectivamente; Figura 11E e F) e sexo feminino ou masculino ($P=0,188$, $P=0,740$ – respectivamente; Figura 11G e H).

Figura 11: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H). Os pacientes foram classificados como >60 anos, entre 52 e 60 anos, entre 46 e 52 anos e ≤46 anos, ou de acordo com o grau de tabagismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o grau de etilismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o sexo dos pacientes. Todas as características não apresentaram diferenças estatísticas. N= nº de pacientes.

Não foi observada nenhuma relação da sobrevida global e da livre de doença dos pacientes em relação o status linfonodal ($P=0,251$; $P=0,113$, respectivamente; Figura 12A e B) e ao tamanho tumoral ($P=0,079$, $P=0,418$, respectivamente; Figura 12C e D). O grau histológico mostrou que os tumores classificados como CE I apresentaram uma tendência a melhor sobrevida comparada ao grupo CE II+III tanto na sobrevida global (CE I: não atingida, CE II+III: 18,77 meses; $P=0,085$; Figura 12E) como na livre de doença (CE I: 41 meses, CE II+III: 7,07 meses; $P=0,064$; Figura 12F), porém sem diferença estatística significativa.

Figura 12: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F). Os pacientes foram de acordo com o comprometimento linfonodal: em pN0 (sem) ou pN+ (com linfonodo comprometido), ou de acordo com o tamanho do tumor primário: os de menor tamanho (pT1+T2) ou maior tamanho (pT3+T4), ou de acordo com o grau de diferenciação: bem diferenciado (CE I) moderado/pouco diferenciado (CE II+III). Os tumores classificados como moderado/pouco diferenciados apresentaram uma tendência de pior sobrevida global ($P=0,085$) e livre de doença ($P=0,064$), porém sem diferença estatística significativa. N= nº de pacientes.

4.3. Expressão de G3BP2, TF e asHTF para CE de laringe.

Para este sítio específico foi observada uma tendência na diminuição da expressão de G3BP2 no tumor primário ($0,52 \pm 1,67$) em relação à mucosa adjacente ($0,62 \pm 1,43$, $n=17$ e $P=0,079$ – teste de Wilcoxon pareado; Figura 13), porém sem diferença estatística. Os genes TF e asHTF não apresentaram diferença estatística entre tumor primário (TF: $0,99 \pm 1,19$; asHTF: $1,11 \pm 1,34$) e a mucosa adjacente (TF: $1,03 \pm 0,84$, $n=17$ e $P=0,246$; asHTF: $1,15 \pm 0,59$, $n=17$ e $P=0,287$ – teste de Wilcoxon pareado; Figura 13).

Figura 13: Comparação dos dados da expressão do gene G3BP2 entre tecido de tumor primário e mucosa adjacente proveniente de 17 pacientes, com carcinoma epidermóide de laringe. Caixas, 25%, 50%, 75%; barras, 10% e 90%; °, representa valores acima dentro do limite de 1,5 a $-3x$ o limite do quartil superior; *, representa valores acima de $3x$ do quartil superior. O RNAm de G3BP2, TF e asHTF não apresentaram diferenças significativas ($P=0,079$, $P=0,246$ e $P=0,287$, respectivamente).

Em seguida foram analisados os valores de expressão relativa do tumor primário com os dados clínicos. Em relação à idade dos pacientes, a mediana calculada para o grupo de CE de língua que foi de 57 anos. Os pacientes que apresentaram idade acima da mediana do grupo foi novamente subdividido pela mediana, onde neste caso foi de 68 anos. O mesmo aconteceu para os pacientes que apresentaram idade menor que 57, eles foram novamente subdivididos pela mediana que nesta situação foi de 52 anos. Assim foi formando quatro grupos (menores que 52 anos, entre 52 e 57 anos, entre 57 e 68 anos e maiores que 68 anos). Não foi encontrada nenhuma diferença estatística para os três genes em relação à idade mediana (G3BP2: $P=0,102$; TF: $P=0,368$; asHTF: $P=0,269$ – Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; Tabela 11). Além disso, esses pacientes também foram divididos pela idade que geralmente é diagnosticado este tipo de câncer, aos 60 anos. Assim, não foi observada nenhuma diferença estatística quando foram comparados os pacientes com idade superior a 60 anos em relação aos de idade inferior de 60 anos para os três genes estudados (G3BP2: $P=0,161$; TF: $P=0,540$; asHTF: $P=0,315$ – Teste não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 11).

Em relação aos demais dados clínicos, não foram encontrados diferenças significativas para os três genes quando levado em consideração o sexo, o grau de tabagismo e o grau de etilismo (G3BP2: $P=0,040$, $P=0,429$, $P=0,151$; TF: $P=0,420$, $P=0,726$, $P=0,245$; asHTF: $P=0,566$, $P=0,920$, $P=0,353$, respectivamente – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 11).

Tabela 11: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de laringe: em relação as características clínicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Idade Mediana*						
>60 anos (8)	0,08±0,05	0,102	0,49±0,68	0,368	0,51±0,63	0,269
Entre 52 e 60 anos (9)	0,14±0,06		1,13±1,49		1,14±1,32	
Entre 46 e 52 anos (10)	0,75±2,2		1,33±1,68		1,37±1,45	
≤46anos (11)	0,09±0,06		1,00±1,27		1,25±1,40	
Idade*						
>60anos (14)	0,11±0,06	0,161	0,87±1,30	0,540	0,86±1,16	0,315
≤60anos (24)	0,37±1,42		1,09±1,36		1,24±1,33	
Sexo**						
Feminino (4)	0,16±0,05	0,040	0,98±0,79	0,420	0,97±0,70	0,566
Masculino (34)	0,29±1,89		1,01±1,38		1,11±1,32	
Tabagismo*						
Grau 0+1 (3)	0,10±0,06	0,585	0,66±0,46	0,867	0,79±0,46	0,769
Grau 2+3+4 (26)	0,30±1,21		1,06±1,40		1,14±1,34	
Etilismo*						
Grau 0+1 (10)	0,68±1,99	0,114	1,33±1,65	0,185	1,43±1,47	0,146
Grau 2+3+4 (19)	0,08±0,06		0,85±1,14		0,95±1,16	

*P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. **P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Os valores de expressão relativa dos genes G3BP2, TF e asHTF no tumor primário também foram analisados com os dados patológicos e não foram encontradas diferenças significativas para G3BP2 e TF em relação o status linfonodal, tamanho tumoral e grau hitológico (G3BP2: $P=0,303$; $P=0,757$; $P=0,649$, respectivamente; TF: $P=0,228$; $P=0,660$; $P=0,257$, respectivamente – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 12). A expressão relativa de asHTF foi menor nos tumores pN+ ($0,87 \pm 1,26$, $n=18$) em relação aos pN0 ($1,30 \pm 1,27$, $n=20$; $P=0,055$ – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 12), porém sem diferença estatisticamente significativo. Para os demais parâmetros a expressão de asHTF não mostrou nenhuma correlação (Tamanho tumoral: $P=0,404$; Diferenciação celular: $P=0,286$ – teste de não paramétrico de Mann-Whitney; Tabela 12).

Tabela 12: Expressão dos genes G3BP2, TF e asHTF em fragmentos de tumor primário de pacientes com CE de laringe: em relação as características patológicas.

Variáveis (n)	Expressão de G3BP2	P	Expressão de TF	P	Expressão de asHTF	P
Linfonodo						
pN0 (20)	0,44±1,54	0,303	1,19±1,44	0,228	1,30±1,27	0,055
pN+ (18)	0,08±0,06		0,81±1,19		0,87±1,26	
Tamanho Tumoral						
pT1+T2 (10)	0,10±0,7	0,757	1,07±1,44	0,660	1,19±1,26	0,404
pT3+T4 (28)	0,33±1,31		0,99±1,31		1,07±1,29	
Diferenciação Celular						
CE I (10)	0,08±0,05	0,649	1,16±1,44	0,257	1,22±1,24	0,286
CEII+III (27)	0,35±1,33		0,97±1,33		1,07±1,32	

P = significância atingida pela análise do Teste não paramétrico de Mann-Whitney. pN0 = Linfonodo não comprometido, pN+ = linfonodo comprometido; CE I = carcinoma epidermóide bem diferenciado, CE II+III = carcinoma epidermóide moderado/pouco diferenciado, respectivamente.

Assim como para os outros dois sítios também foi calculado a correlação de Pearson entre os genes. Neste caso não foi observado nenhuma ligação entre a expressão de G3BP2 com a expressão de TF ($P=0,754$) como a expressão de asHTF ($P=0,926$). Entre a expressão de TF e da sua isoforma asHTF houve uma correlação direta ($r=0,960$; $P<0,001$).

Em relação as curvas de sobrevida não foi observada nenhuma diferença estatística significativa quando a sobrevida global e livre de doença foi analisada em relação à expressão de G3BP2 ($P=0,816$; $P=0,910$, respectivamente – Teste de Log-rank; Figura 14A e B), TF ($P=0,359$; $P=0,335$, respectivamente; Figura 14C e D) e asHTF ($P=0,841$; $P=0,789$, respectivamente; Figura 14E e F).

Figura 14: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a expressão tumoral dos RNAm de G3BP2 (A, B), TF (C, D), asHTF (E, F). Os pacientes foram classificados em positivos (acima) ou negativos (igual ou abaixo) de acordo com a mediana da expressão no tumor primário dos genes analisados. Nenhum dos três RNAm analisado mostrou correlação com a sobrevida global e livre de doença dos pacientes. N= nº de pacientes.

Não foi observada nenhuma relação da sobrevida global e da livre de doença dos pacientes em relação a idade mediana ($P=0,468$; $P=0,585$, respectivamente; Figura 15A e B), ao grau de tabagismo ($P=0,290$, $P=0,299$ – respectivamente; Figura 15C e D), grau de etilismo ($P=0,566$, $P=0,632$ – respectivamente; Figura 15E e F) e sexo feminino ou masculino ($P=0,701$, $P=0,835$ – respectivamente; Figura 15G e H).

Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com a idade mediana (A, B), Tabagismo (C, D), Etilismo (E, F), Sexo (G, H). Os pacientes foram classificados como >60 anos, entre 52 e 60 anos, entre 46 e 52 anos e ≤46 anos, ou de acordo com o grau de tabagismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o grau de etilismo: grau 0+1 e grau 2+3+4, ou de acordo com o sexo dos pacientes. Todas as características não apresentaram diferenças estatísticas. N= nº de pacientes.

A status linfonodal para os tumores de laringe foi o único marcador patológico que mostrou significância tanto para sobrevida global (pN0: não atingido; pN+: 17,87 meses; $P=0,046$; Figura 16A) como livre de doença (pN0: não atingido; pN+: 8,93 meses; $P=0,046$; Figura 16B). Não foi observada nenhuma relação da sobrevida global e da livre de doença dos pacientes em relação o tamanho tumoral ($P=0,531$, $P=0,511$, respectivamente; Figura 16C e D) e o grau histológico ($P=0,184$, $P=0,180$, respectivamente; Figura 16E e F).

Figura 15: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global e livre de doença de acordo com o estadiamento linfonodal (A, B), tamanho do tumor primário (C, D), grau histológico (E, F). Os pacientes foram de acordo com o comprometimento linfonodal: em pN0 (sem) ou pN+ (com linfonodo comprometido), ou de acordo com o tamanho do tumor primário: os de menor tamanho (pT1+T2) ou maior tamanho (pT3+T4), ou de acordo com o grau de diferenciação: bem diferenciado (CE I) moderado/pouco diferenciado (CE II+III). Os tumores classificados como pN+ apresentaram uma pior sobrevida global ($P=0,046$) e livre de doença ($P=0,046$). N= nº de pacientes.

5. Discussão

Neste estudo, foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos dos genes G3BP2, TF e asHTF pela técnica de PCR em tempo real em tumor primário de 70 pacientes com CE de cavidade oral, 35 de língua e em 43 de laringe.

Os resultados relativos ao gene G3BP2 indicaram menor expressão do gene no tumor primário em relação à mucosa adjacente nos três sítios estudados, porém sem diferença significativa na laringe. Resultados contrários aos nossos foram descritos em câncer de mama, sendo que esses autores observaram um aumento de expressão da proteína G3BP2, por imunohistoquímica, nos tecidos tumorais e uma correlação direta com progressão da doença (French et al., 2002). Essa diferença com relação aos nossos achados em tumores de cabeça e pescoço pode estar relacionada com a diferença dos sítios analisados, pois apesar de serem de origem embrionária epitelial são tipos de cânceres de características distintas. Além disso, no estudo de French et al. (2002) a metodologia utilizada avaliou a proteína de G3BP2 enquanto este estudo avaliou a expressão do RNAm, assim as contradições observadas podem ser decorrentes das diferenças metodológicas. Assim, o papel que G3BP2 pode exercer nos tumores de cabeça e pescoço seria a sua ligação ao complexo I κ B α /NF- κ B mantendo-o no citoplasma como descrito por Prigent et al. (2000). NF- κ B estando livre do seu inibidor (I κ B α) migraria do citoplasma para o núcleo (Chen e Goeddel, 2002; Prigent et al., 2000) e executaria seu papel de fator transcricional ativando genes que promovem a proliferação celular e genes que codificam proteínas anti-apoptóticas (Li et al., 2005). A atividade aberrante de NF- κ B

foi claramente observada na contribuição da sobrevida celular, proliferação, migração e resistência à radiação em uma variedade de tumores (Squarize et al., 2006) assim como no carcinoma de cabeça e pescoço (Ondrey et al., 1999).

Neste estudo, foi observado uma correlação de maior expressão do gene TF e sua isoforma asHTF no tumor primário com o comprometimento linfonodal tanto no CE de cavidade oral como em língua. Além disso, também foi observado que a maior expressão de TF e asHTF no tumor primário estava correlacionado com a pior sobrevida livre de doença dos pacientes com CE de cavidade oral e ambos apontam ser um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença. Somado a isso, foi observado em cavidade oral uma concordância de resultados entre o RNAm e a proteína de TF e asHTF sugerindo que sua presença possa realmente influenciar no comportamento do câncer.

O fato de encontrarmos correlação desses genes com tumores de cavidade oral e língua e não com tumores de laringe poder ser decorrente da diferença existente entre os sítios analisados, pois apesar do carcinoma de cabeça e pescoço compreender todos os três sítios, o comportamento do desenvolvimento do tumor parece ser distinto. No trabalho de Wojtukiewicz et al. (1999) a proteína de TF foi encontrada nos carcinomas de laringe, porém sem comparação com um tecido normal, com os dados clínico-patológicos ou sobrevida.

Em concordância com nossos resultados, dados da literatura demonstram que em 113 pacientes com adenocarcinomas de ductos

pancreáticos apresentaram um aumento da expressão da proteína de TF, por imunohistoquímica, em tumores linfonodo positivos (pN+) e em tumores de estadio e grau histológico avançado (Nitori et al., 2005). Outro achado deste grupo foi à correlação da expressão da proteína de TF com a sobrevida dos pacientes, onde a diminuição da proteína estava relacionada com o melhor prognóstico mesmo quando estes apresentavam linfonodos comprometidos.

Em um estudo com 79 pacientes com tumor de cólon Shigemori et al. (1998) observaram por imunohistoquímica, que a expressão de TF foi significativamente mais freqüente em tumores com comprometimento linfonodal e em tumores com metástase no fígado. Outro grupo que estudou 100 pacientes com câncer de cólon observou, por imunohistoquímica, que tumores positivos para a proteína de TF foram mais presentes em tumores com alta densidade de microvasos (Nakasaki et al., 2002). A densidade de microvasos é importante para a carcinogênese uma vez que está associada com o aumento da incidência de metástase (Tomoda et al., 1999). Nakasaki et al. (2002) também observaram que a presença da proteína de TF estava freqüentemente associada com tumores com comprometimento linfonodal e com tumores que apresentaram metástase no fígado. Já no trabalho de Seto et al. (2000) também em carcinoma de cólon, dos 67 pacientes analisados por imunohistoquímica foi observada correlação com o estadiamento tumoral e o grau histológico. Além disso, foi observada uma correlação significativa entre a expressão positiva da proteína de TF com o pior prognóstico.

Somado a isso, um trabalho comparou os resultados de TF obtidos na imunohistoquímica com os obtidos pelos níveis citosólicos do tumor medido por ELISA em 58 pacientes em tumores hepatocelulares (Poon et al., 2003). Nesta situação eles observaram que os tumores que apresentavam altos níveis de expressão por imunohistoquímica também apresentavam altos níveis de expressão por ELISA. Além disso, eles observaram que a expressão dos níveis citosólicos de TF foi mais elevado em tumores moderado ou pouco diferenciado comparado aos bem diferenciados entre outras características patológicas e observaram por fim, que os pacientes que apresentavam alta expressão citosólica de TF apresentaram pior sobrevida.

Ainda em relação aos trabalhos que concordam com os resultados observados neste estudo, Koomagi & Volm (1998) estudaram 191 pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas por imunohistoquímica. Neste estudo eles verificaram que a alta expressão de TF estava relacionada com a alta densidade de microvasos, além de estar correlacionado com a expressão de VEGF, sugerindo assim, que TF pode funcionar como um fator de angiogenese adicional. Além disso, eles também observaram a correlação da alta expressão de TF com a pior sobrevida e conseqüentemente com o pior prognóstico. No estudo do grupo de Ueno et al. (2000), observaram, por ELISA, uma alta expressão dos níveis plasmáticos de TF nos tumores primários de mama quando comparados aos controles normais. A proteína de TF também foi avaliada por imunohistoquímica nos 213 pacientes com tumor primário de mama e assim

eles verificaram a correlação da maior expressão de TF com pior sobrevida dos pacientes. Por fim, no estudo de carcinoma de próstata Akashi et al. (2003), em 73 pacientes por imunohistoquímica, observaram que os pacientes com forte expressão de TF apresentaram menor sobrevida em relação aos que não expressavam a proteína. Assim, todos esses trabalhos descritos acima mostram a íntima relação da maior expressão de TF com o pior prognóstico assim como foi observado neste presente estudo.

Apesar das correlações da expressão de TF com pN e sobrevida, TF não estava correlacionada com o tamanho tumoral ou com o grau histológico em nenhum dos três sítios estudados. No câncer hepatocelular (Poon et al., 2003) foi observado que TF apresentava correlação com pN, grau histológico e sobrevida, porém sem relação com tamanho tumoral e sugerindo que a expressão de TF pode influenciar na invasão tumoral independente do tamanho que o tumor apresenta, isso também pode acontecer nos tumores de cavidade oral e língua.

Frente a isso, uma possível explicação para os resultados encontrados e para a relação de TF com a invasão tumoral seria através da formação do complexo TF-FVIIa ou do complexo TF-FVIIa-FXa. Esses complexos seriam capazes de diminuir os níveis da caspase-3 em células MDA-MB-231 mantidas em meio livre de soro inibindo, assim, a apoptose (Åberg et al., 2008). Em células Adr-MCF-7, também mantidas em meio livre de soro, o complexo TF-FVIIa-FXa foi suficiente para interferir diretamente na ativação da procaspase-3 (Jiang et al., 2006).

O complexo TF-FVIIa-FXa também pode ser capaz de induzir a fosforilação de p44/42 MAPK (Jiang et al., 2004; Sorensen et al., 2003). Porém, Jiang et al. (2004) verificaram que as baixas concentrações do fator VIIa, próximas dos níveis fisiológicos, não são suficientes para iniciar a sinalização celular e que a geração do fator Xa é essencial para a indução da fosforilação da MAPK pelo complexo TF-FVIIa e tudo isso ocorre sem a necessidade da formação da trombina nas células Adr-MCF7. Além disso, eles observaram que a fosforilação da MAPK pelo complexo TF-FVIIa-FXa foi mediada por PAR-1 ou 2 (*Protease-activated Receptors*) e também observaram que a ativação de PAR-2 aumentava a migração celular enquanto a ativação de PAR-1 diminuía.

A família das moléculas PARs são conhecidas por contribuir para a mobilidade da célula tumoral e metástase (Shi et al., 2004), porém não está claro se todos os membros da família ou apenas um tipo específico pode auxiliar na migração celular. O que se sabe é que um picomolar de FVIIa é o suficiente para ativar PAR-2 quando TF e Xa estão presentes e isto resulta em uma cascata de eventos que ocorrem na superfície da célula (Camerer et al., 2000). Além disso, Belting et al. (2004) evidenciaram um aumento das características fisiológicas e patológicas da angiogênese devido a uma deleção genética do domínio citoplasmático de TF que manteve continuamente PAR-2 ativo.

Outra via celular que potencialmente é ativada pelo complexo TF-FVIIa-FXa é a do AKT/PKB (Åberg et al., 2008). A via do AKT/PKB é importante para a carcinogênese por ser uma proteína chave na

sobrevivência celular, proliferação e por estar envolvida no processo anti-apoptótico inibindo várias proteínas importantes como p53, p21, entre outros (Goswami et al., 2006). Algumas das consequências da ativação da via AKT/PKB é a ativação do complexo I κ B/NF- κ B o que permite a liberação do NF- κ B e a realização do seu papel de fator transcrricional na célula (Song et al., 2008). Outra molécula que é ativada pela via AKT/PKB é o mTOR (Grant, 2008). Este, dentro deste contexto se torna importante por estar envolvido com a biogênese dos ribossomos e metabolismo levando, assim, ao aumento da proliferação celular (Sabassov et al., 2005) e da migração celular em linhagens celulares de câncer de mama (Jiang et al., 2008). Outra consequência da ativação do complexo TF-FVIIa seria no aumento da expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, através da ativação da via JAK/STAT5, que resulta na resistência a apoptose nas linhagens celulares de neuroblastoma (Fang et al., 2008).

Além disso, os resultados obtidos da expressão de asHTF em tumores de cavidade oral e língua parecem ser promissores pois, o mesmo perfil de expressão do RNAm de asHTF foi observado em tumores de pulmão (Goldin-Lang et al., 2008). Ainda existem indícios de que essa isoforma de TF possa levar ao aumento do crescimento tumoral regulando a angiogenese (Hoobs et al., 2007; Signaevsky et al., 2008), embora o mecanismo não seja claro. O que se sabe é que em células endoteliais da veia umbilical humana, TNF- α e IL-6 mostraram-se capazes de induzir a expressão do RNAm e da proteína de asHTF assim como a de TF (Szotowski et al., 2005).

Neste estudo também foi verificado se o aumento da expressão dos RNAm dos três genes estavam correlacionadas. O aumento da expressão de G3BP2 foi correlacionada com o aumento da expressão de TF e asHTF nos tumores de cavidade oral, porém nos outros sítios estudados não estavam correlacionados. Uma possível explicação para o acontecido seria porque o aumento da expressão do TF e possivelmente de asHTF poderia aumentar a atividade de NF- κ B via ativação do AKT (Åberg et al., 2008; Song et al., 2008). G3BP2, por outro lado, poderia inibir essa atividade ligando-se ao complexo I κ B α /NF- κ B e mantendo-o no citoplasma (Prigent et al., 2000). Entretanto, com o aumento do TF, AKT pode ser ativado que geraria a degradação de I κ B α liberando NF- κ B e por consequência G3BP2 acabaria ligado apenas com I κ B α e diminuindo, desta forma, sua ação protetora. Assim, o gene de G3BP2 poderia ser selecionado através da ativação de outras vias de sinalização a aumentar sua expressão para possivelmente unir-se mais rapidamente com o complexo I κ B α /NF- κ B antes que este se desfaça.

Em todos os sítios, a expressão de TF está diretamente ligada a expressão de asHTF, isto é, quando os tumores apresentavam aumento de expressão de TF também apresentavam aumento de expressão de asHTF. Assim, apesar de asHTF não ter a região ancorada a membrana plasmática, essa isoforma parece ser controlada da mesma forma que a isoforma original. Se a função está preservada ou não, nosso estudo não permite concluir.

Em resumo, asHTF e TF parecem ser marcadores prognósticos nos carcinomas epidermóides de cavidade oral principalmente na sobrevida livre de doença e merece ser melhor estudado. Quanto ao G3BP2, não observamos nenhuma correlação com os dados clínicos patológicos.

6. Conclusão

Neste trabalho foi avaliado, prospectivamente, a expressão do RNAm de G3BP2, TF e asHTF como possíveis marcadores prognósticos para pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e as conclusões foram:

- A expressão de RNAm G3BP2 foi menor nos tumores primário em relação à mucosa adjacente nos três sítios estudados e não foi encontrado nenhuma correlação entre expressão de G3BP2 e dados clínico – patológicos.
 - A expressão de RNAm de TF e asHTF foram maiores em pacientes com tumores pN+ em CE de cavidade oral e língua;
 - Pacientes com CE de cavidade oral com maior expressão de TF e asHTF apresentaram pior sobrevida livre de doença;
 - Para a análise multivariada de COX TF e asHTF apresentaram significância, onde o aumento da expressão representou um maior risco de morte;
 - O ensaio de Western Blotting confirmou os resultados obtidos na RT- PCR em tempo real para TF e asHTF;
 - O expressão de TF e asHTF parecem ser marcadores prognósticos nos CE de cavidade oral principalmente em relação a sobrevida livre de doença;
 - Nenhum dos três genes estudados neste trabalho mostrou alguma correlação com os tumores de laringe.
-

7. Referências Bibliográficas

Åberg M, Wickström M, Siegbahn A. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells in a NFkappaB-dependent manner and abolishes the anti-apoptotic signaling of TF/FVIIa and TF/FVIIa/FXa. *Thromb Res.* 2008; 122(2):191-202.

Agra IM, Carvalho AL, Ulbrich FS, De Campos OD, Martins EP, Magrin J, Kowalski LP. Prognostic factors in salvage surgery for recurrent oral and oropharyngeal cancer. *Head Neck.* 2006; 28(2): 107-113.

Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 2003; 62(6): 1078-1082.

Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Should there be more molecular staging of head and neck cancer to improve the choice of treatments and thereby improve survival? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 16(2):117-126.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64(15): 5245-5250.

Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58(3): 959-965.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008; 371(9625):1695-1709.

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 2004; 10(5): 502-509.

Bernards A, Settleman J. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors.* 2005;23(2):143-9.

Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.* 2004; 40(2): 110-119.

Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2006; 28(10): 916-925.

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003; 9(4): 458-462.

Buchs AE, Zehavi S, Sher O, Yeheskely E, Muggia-Sulam M, Sherman Y, Rapoport MJ. Heparanase, galectin-3, and tissue factor mRNA are expressed in benign neoplasms of the thyroid. *Endocrine*. 2003; 22(2): 81-84.

Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, Iversen JG, Prydz H. Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the *egr-1* gene. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32225-32233.

Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(10): 5255-5260.

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002; 296(5573): 1634-1635.

Chomczynski, P; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.

Erovic BM, Pammer J, Hollemann D, Woegerbauer M, Geleff S, Fischer MB, Burian M, Frommlet F, Neuchrist C. Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2003; 25(10): 848-857.

Fang J, Gu L, Zhu N, Tang H, Alvarado CS, Zhou M. Tissue factor/FVIIa activates Bcl-2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BMC Cancer*. 2008; 8: 69.

Forster Y, Meye A, Albrecht S, Kotzsch M, Fussel S, Wirth MP, Schwenzer B. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Lett*. 2003; 193 (1): 65-73.

French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD. The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J*. 2002; 34: 223-231.

Geyer M, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 1997; 7(6):786-792.

Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(4): 1259-1266.

Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control*. 2002; 9(5): 369-378.

Goldin-lang P, Tran QV, Fichtner I, Eisenreich A, Antoniak S, Schulze K, Coupland SE, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol Rep.* 2008; 20(1):123-128.

Goswami A, Ranganathan P, Rangnekar VM. The phosphoinositide 3-kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer-selective therapeutic target. *Cancer Res.* 2006; 66(6):2889-2892.

Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer. *J Clin Invest.* 2008; 118(9): 3003-3006.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabiánová E, Bencko V, Moullan N, Chabrier A, Hung R, Hall J, Canzian F, Brennan P. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):696-703.

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood.* 2004; 103(8):3029-3037.

Hobbs JE, Zakarija A, Cundiff DL, Doll JA, Hymen E, Cornwell M, Crawford SE, Liu N, Signaevsky M, Soff GA. Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model. *Thromb Res.* 2007; 120(Suppl 2):13-21.

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa de 2008: Incidência de Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Irvine K, Stirling R, Hume D, Kennedy D. Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(10): 1065-1077.

Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, Cappello M, Konigsberg WH, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(1): 93-101.

Jiang X, Guo YL, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb Haemost.* 2006; 96(2):196-201.

Jiang X, Zhu S, Panetti TS, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex induces activation of the mTOR pathway which regulates migration of human breast cancer cells. *Thromb Haemost.* 2008;100(1):127-133.

Kim MM, Wiederschain D, Kennedy D, Hansen E, Yuan ZM. Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene*. 2007; 26(29): 4209-4215.

Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer*. 1998; 79(1): 19-22.

Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene*. 2007; 26(32):4609-4616.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10):725-734.

Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol*. 2005; 26(6): 318-325.

Manual de Condutas do Serviço de Oncologia INRAD. Serviço de Oncologia Clínica; Divisão de Oncologia – Instituto de Radiologia HCFMUSP. 1ª Versão; 2003.

Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G, Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996; 74(8): 1253-1257.

Murphy RM, Watt KK, Cameron-Smith D, Gibbons CJ, Snow RJ. Effects of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time RT-PCR. *Physiol Genomics*. 2003; 12(2): 163-174.

Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol*. 2002; 69 (4): 247-254.

Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(7): 2531-2539.

Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog*. 1999; 26(2):119-129.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(27): 2817-2826.

Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B. A Ras-GTPase-Activating Protein SH3-Domain-Binding Protein. *Mol Cell Biol*. 1996; 16 (6): 2561–2569.

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

Pasini 2005

Pendurthi UR, Ngyuen M, Andrade-Gordon P, Petersen LC, Rao LV. Plasmin induces Cyr61 gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(9):1421-1426.

Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol*. 2008; 9:17.

Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(14): 5339-5345.

Prigent M, Barlat I, Langen H, Dargemont C. IkappaBalpha and IkappaBalpha /NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem*. 2000; 275 (46): 36441-36449.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997; 245 (2): 154-160.

Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(1):47-56.

Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res*. 2005; 65(4):1406-1413.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17(6):596-603.

Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, Imamura M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer*. 2000; 88(2): 295-301.

Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*. 2004; 2(7): 395-402.

Shigemori C, Wada H, Matsumoto K, Shiku H, Nakamura S, Suzuki H. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost*. 1998; 80(6):894-898.

Signaevsky M, Hobbs J, Doll J, Liu N, Soff GA. Role of alternatively spliced tissue factor in pancreatic cancer growth and angiogenesis. *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34(2):161-169.

Song J, Lei FT, Xiong X, Haque R. Intracellular signals of T cell costimulation. *Cell Mol Immunol*. 2008; 5(4): 239-247.

Sorensen BB, Rao LV, Tornehave D, Gammeltoft S, Petersen LC. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood*. 2003; 102(5):1708-1715.

Steckelbroeck S, Watzka M, Lütjohann D, Makiola P, Nassen A, Hans VH, Clusmann H, Reissinger A, Ludwig M, Siekmann L, Klingmüller D. Characterization of the dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism via oxysterol 7 α -hydroxylase and 17-ketosteroid reductase activity in the human brain. *J Neurochem*. 2002; 83(3): 713-726.

Sturgis EM, Wei Q. Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 2002; 14(3):310-317.

Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS JR, Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NF κ B and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006; 8(9): 733-746.

Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res*. 2005; 96(12): 1233-9.

Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F. Ras-GTPase activating protein (GAP): a putative effector for Ras. *Cell Signal*. 1997; 9(2):153-158.

Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer*. 1999; 85(11): 2340-2346.

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Bronze GJ Jr. Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 6922-6929.

Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer*. 2000; 83: 164– 170.

UICC. União Internacional Contra o Câncer. *Manual de oncologia clínica*. 6^a Edição. Springer-Verlang; 1999.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7).

Versteeg HH, Hoedemaeker I, Diks SH, Stam JC, Spaargaren M, Van Bergen EN, Henegouwen PM, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J Biol Chem*. 2000; 275(37):28750-28756.

Versteeg HH, Spek CA, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Tissue factor haploinsufficiency during endotoxin induced coagulation and inflammation in mice. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(12): 2185-2193.

Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Rucinska M, Zimnoch L, Jaromin J, Rozanska-Kudelska M, Kisiel W, Kudryk BJ. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb Haemost*. 1999; 82(6): 1659-1662.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz rl, Hung MC. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(1): 3-9.