UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas e Toxicológicas

Impacto do alelo FGFR4 Arg^{388} no prognóstico do carcinoma espino celular primário de cabeça e pescoço

Valéria Cristina da Costa Andrade

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bernardo Garicochea

São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas e Toxicológicas

Impacto do alelo FGFR4 Arg^{388} no prognóstico do carcinoma espino celular primário de cabeça e pescoço

Valéria Cristina da Costa Andrade

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bernardo Garicochea

São Paulo
2004

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Valéria Cristina da Costa Andrade

Impacto do alelo FGFR4 Arg^{388} no prognóstico do carcinoma espino celular primário de cabeça e pescoço

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Bernardo Garicochea
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

INDICE

1. INTRODUÇÃO *4*

1.1 Epidemiologia do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço **5**

1.2 Etiopatologia e fatores de risco do CEC de cabeça e pescoço **6**
Tabagismo 6
Etilismo 7
Infeção viril 7
Dieta 7
Lesões precursoras 7

1.3 Patologia e do CEC de cabeça e pescoço **8**
Diferenciação tumoral 9
Margem cirúrgica 9
Tamanho do tumor 10
Localização 10
Linfonodos e metástases regionais 10
Fatores prognósticos dos linfonodos cervicais 12
Metástase do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço 12

1.4 Estadiamento do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço **12**

1.5 Campo de Cancerização **15**

1.6 História natural e epidemiologia molecular do CEC de cabeça e pescoço **18**

1.7 Caracterização e função dos receptores de fator de crescimento do fibroblasto **21**

2. OBJETIVOS *26*

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS *28*

3.1 Casuística **29**
Características da população estudada 29

3.2 Métodos **30**
3.2.1 Extração do DNA 30
3.2.2 CHELEX-100 30
3.2.3 Kit Nucleon HT para tecidos duros da Amersham Life Science. 31
3.2.4 Fenol-Cloroformio-Alcool-Isoamílico (FCAI) 31
3.2.5 Avaliação integridade do DNA 32
3.2.6 Eficácia dos métodos de extração do ácido nucleico 32
3.2.7 Protocolo de seqüenciamento do gene hMSH2 33
3.2.8 PCR-RFLP do exon 9 do *FGFR4* 33
3.2.9 PCR do exon 9 do *FGFR4* 33
3.2.10 RFLP (digestão) do exon 9 do gene *FGFR4* 34
3.2.11 Seqüenciamento do exon 9 do gene *FGFR4* 34

3.3 Análise estatística **35**

4. RESULTADOS *36*

4.1 Extração de DNA **37**
4.1.2 Resultados e análise dos métodos testados para extração de DNA com CHELEX-100 5% 37
4.1.3 Resultados e análise dos métodos testados para extração de DNA com Kit Nucleon HT para tecidos duros da Amersham Life Science 38

4.1.4 Resultados e análises dos métodos testados para extração de DNA com Fenol-Clorofórmio-Álcool-isoamílico (FCAI) 38
4.1.5 Integridade do gel 40
4.1.6 Avaliação da eficácia dos métodos de extração do ácido nucleico, pela amplificação do gene Hmsh2. 41
4.1.7 Seqüenciamento do exon 3 do gene hMSH2 41
4.1.8 PCR do alelo FGFR4 Arg^{388} (exon 9) 42
4.1.9 RFLP do alelo FGFR4 Arg^{388} 43
4.1.10 Seqüenciamento do exon 9, ... 44
alelo FGFR4 Arg^{388} 44

4.2 Análise estatística 46

5. DISCUSSÃO ***56***

6. CONCLUSÃO ***66***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ***68***

Nota da BCQ: No impresso, não constam as páginas 3 e 4

Impacto do alelo FGFR4 Arg^{388} no prognóstico do Carcinoma espino celular de cabeça e pescoço.

Autora: Valéria Cristina da Costa Andrade
Orientador: Bernardo Garicochea
Nível: Mestrado
vcca@uol.com.br

Introdução: O alelo do gene FGFR4 (FGFR4 Arg^{388}) foi descrito como um fator prognóstico independente para o câncer de mama, cólon e sarcoma de tecidos moles. O objetivo deste foi avaliar o impacto deste alelo nos pacientes portadores de carcinoma espino celular primário de cabeça e pescoço (CECPCP).
Material e Métodos: 75 pacientes portadores CECPCP foram avaliados quanto a presença do alelo FGFR4 Arg^{388}, mediante as técnica de PCR-RFLP e seqüenciamento. Os tumores foram classificados de acordo ao alelo FGFR4Gli^{388} (homozigoto para glicina, Gli-Gli), FGFR4Gli/Arg^{388} (heterozigoto glicina e arginin, Gli-Arg) ou FGFR4Arg^{388} (homozigoto para arginina, Arg/Arg) e foram correlacionados aos dados clínicos e evolução.
Resultados e conclusão: Observou-se que os pacientes portadores deste alelo possuem 2,2 vezes mais chance de óbito em relação aos pacientes portadores do alelo alelo FGFR4 Gli^{388} . O alelo FGFR4 Arg^{388} mostrou ter um impacto importante na sobrevida dos pacientes portadores CECPCP.

Palavras chaves: FGFR4 , CÂNCER E CABEÇA E PESCOÇO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço

O carcinoma espino celular (CEC) representa mais de 90% dos tumores de cabeça e pescoço. Este tumor caracteriza-se pela proliferação de células do epitélio estratificado, que freqüentemente invadem o tecido adjacente (PARISE, 2000). Na maioria dos casos descritos ocorre a partir da quinta década de vida e raramente é observado na população jovem (SHAH et al., 1995).

O CEC de cabeça e pescoço é sétimo tumor mais freqüente no Brasil e o sexto no mundo. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), 83 % deste tipo de câncer ocorre em países em desenvolvimento, com uma proporção incidente de 4 homens para 1 mulher (http://www.inca.gov.br e HASINA et al., 2003).

Nos Estados Unidos, a estimativa da incidência e mortalidade do CEC de cabeça e pescoço para o ano de 2003 foi de 27.700 novos casos e de 7.200 óbitos, segundo a Organização Mundial da Saúde (http://www.cancer.gov). No Brasil, para este mesmo ano, a estimativa foi de 10.635 novos casos e 3.245 óbitos (http://www.inca.gov.br).

Geograficamente há uma grande variação na incidência do CEC de cabeça e pescoço. As diferenças ocorrem devido ao estilo de vida dos indivíduos, nas diferentes regiões. Nos Estados Unidos, por exemplo, a alta incidência da doença entre os homens que moram na zona urbana parece estar principalmente relacionada à exposição crônica de álcool e tabaco. Na zona rural do país o consumo de rapé aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de cavidade oral, em mulheres (WAGMAN et al., 2003). Os trabalhadores rurais, principalmente dos países em desenvolvimento e de economia predominantemente agrícola, constituem a categoria ocupacional mais acometida por este tipo de câncer. Um dos principais fatores responsáveis é a exposição prolongada à radiação Ultra Violeta (UV), e o lábio inferior é o local mais atingido (GERVÁSIO et al., 2001).

A relação de mortalidade dos CEC de boca, faringe e laringe em algumas áreas do Brasil está entre as mais altas do mundo e, em geral, este tipo de câncer encontra-se já em

estágio avançado ao diagnóstico. Na cidade de São Paulo a incidência do CEC de cavidade oral é a segunda do mundo (NAGAI et al., 1998) ficando atrás apenas da Índia, onde este câncer representa 50% dos canceres que ocorrem no país (MYERS et al., 1996). A alta incidência do CEC nestas regiões se relaciona, principalmente, ao consumo de tabaco. Na Índia as variantes do tabagismo como: mascar tabaco com betel (*pan*), fumar cigarro envolto com ébano (*bidi*) e o consumo de *chutta* (espécie de cigarro fumado com a extremidade acesa dentro da boca), fazem com que este tipo de câncer seja o mais incidente no país (MYERS et al., 1996).

1.2 Etiopatologia e fatores de risco do CEC de cabeça e pescoço

A etiopatologia do CEC de cabeça e pescoço é multifatorial (GERVÁSIO et al., 2001) e está fortemente relacionada à exposição aos seus fatores de risco. O consumo de tabaco é a principal causa da doença (BRENNAN et al., 1995; GONZÁLEZ et al., 1995 e MAULA et al., 2003). Diversos agentes químicos, físicos e biológicos podem atuar isolados ou em conjunto para aumentar o risco deste tipo de câncer, principalmente na cavidade oral (PARISE, 2000).

Os principais fatores de risco que sabidamente aumentam as chances para o desenvolvimento do CEC de cabeça e pescoço são:

Tabagismo

O cigarro possui por volta de 60 substâncias carcinogênicas conhecidas, que se dividem em três grupos principais: nitrosaminas, benzopirenos e aminas aromáticas. A diversidade do hábito do tabagismo e o consumo de tabaco sem emissão de fumaça, como por exemplo mascar tabaco com betel e o consumo de rapé, contribuem igualmente para o desenvolvimento da doença. O risco para o desenvolvimento de câncer nos fumantes é aumentado em 6 vezes em relação à população não fumante e este risco sobe para 20 vezes se a localização for a laringe (WAGMAN et al., 2003). Aproximadamente 90% dos pacientes portadores de câncer na cavidade oral consomem tabaco (MYERS et al., 1996 e PORTUGAL et al., 1997). O consumo crônico e concomitante de tabaco e álcool pode aumentar em 142 vezes o risco de um indivíduo vir desenvolver CEC de cabeça e pescoço, em relação a outro que não tenha nenhum dos hábitos (http://www.inca.gov.br).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Etilismo

O aumento da permeabilidade da mucosa bucal pelo álcool, parece facilitar a ação dos agentes químicos. O consumo prolongado do álcool isoladamente, aumenta o risco do desenvolvimento do carcinoma de cavidade oral em 6 vezes (PORTUGAL et al., 1997). A deficiência de vitaminas, a diminuição da capacidade destoxificante do fígado e a desnutrição, conseqüentes do etilismo crônico, foram vistas promover a carcinogênese deste tipo de tumor (MYERS et al., 1996).

Infeção viril

A etiologia viral associada ao CEC de cabeça e pescoço é encontrada em aproximadamente 15% dos casos. O papiloma vírus humano (HPV) já foi detectado em câncer de cavidade oral e a presença deste vírus foi descrita, como um fator de risco independente aos hábitos de tabagismo e etilismo (PORTUGAL et al., 1997). Estudos epidemiológicos deste vírus no CEC de cabeça e pescoço, revelam que sua presença varia entre 10% a 40% dos casos e os HPV 16 e 18 são os tipos prevalecentes (MCKAIG et al., 1998). O Epstein-Barr vírus já foi descrito estar associado com a etiologia do carcinoma de nasofaringe (HIRANUMA et al., 1998).

Dieta

Vários estudos epidemiológicos confirmaram o efeito protetor conferido pelas vitaminas A, C e carotenóides (presentes em frutas, vegetais e pães) contra o câncer da cavidade oral, em indivíduos tabaquistas e etilistas (MYERS et al., 1996).

Lesões precursoras

As lesões precursoras possuem um alto potencial de malignização, principalmente nos indivíduos considerados dentro do grupo de risco para o câncer de boca. Elas se dividem em dois grupos, lesões brancas e vermelhas. As lesões brancas se caracterizam pela coloração acinzentada ou esbranquiçada e as principais são: leucoplasias, líquen plano e ceratose actínica. A eritroplasia é a principal lesão vermelha considerada como risco de câncer aumentado. Embora a eritroplasia seja mais rara do que as leucoplasias, esta

possui um potencial de malignização maior. Outras lesões vermelhas consideradas precursoras são: líquen plano erosivo, lúpus eritematoso e a candidíase eritematosa (CORTESINA et al., 1993).

Além dos fatores de risco citados acima, a doença possui correlações com: a exposição crônica à fumaça emitida por fogão à lenha (em ambientes pouco arejados) e consumo de chimarrão, principalmente no CEC de cavidade oral, faringe e laringe (PINTOS et al. 1998); imunodepressão, próteses dentárias mal ajustadas, má higiene oral e, consumo de maconha (embora seu grau de risco seja desconhecido) (PARISE, 2000 e WAGMAN et al., 2003).

Qualquer indivíduo que tenha alguma alteração no trato aerodigestivo superior por mais de duas semanas ou que tenha uma protuberância tecidual assintomática no pescoço, deve ser examinado com suspeita de carcinoma (WAGMAN et al., 2003).

1.3 Patologia e do CEC de cabeça e pescoço

O CEC de cabeça e pescoço apresenta um padrão macroscópico de crescimento exofítico, ulcerativo e verrucoso. A lesão exofítica apresenta-se como uma massa de tecido endurecida à apalpação. A lesão ulcerativa exibe úlceras de bordas elevadas e fundo necrótico e a lesão verrucosa é caracterizada por projeções papilares. Estas duas últimas lesões descritas estão mais associadas com a destruição dos tecidos vizinhos, possivelmente por isso, possuem um potencial maior de malignidade (PONTES et al., 1996).

O tumor se caracteriza pela proliferação de células da camada espinhosa, que freqüentemente formam blocos ou ilhas, invadindo o tecido adjacente. A atipia e o pleomorfismo (formas celulares variadas de uma mesma espécie) das células, a presença de diferenciação epidermóide sob a forma de queratinização citoplasmática e a presença de pontes intercelulares variam de acordo com o grau histológico (PARISE, 2000).

As características anatomopatológicas encontradas no CEC de cabeça e pescoço são ferramentas importantes, que possuem impacto em seu prognóstico, monitoramento clínico e conduta terapêutica. As principais serão descritas a seguir.

Diferenciação tumoral

O CEC de cabeça e pescoço pode ser classificado histologicamente como tumor bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. O grau histológico é baseado na quantidade de queratinização. Os tumores bem diferenciados possuem uma intensa produção de queratina pelas células neoplásicas e podem ser identificados pela formação de agregados de material queratótico, denominados pérolas córneas. Esses tumores possuem mínimo pleomorfismo, poucas mitoses e uma queratinização maior que 75%. Os tumores moderadamente diferenciados possuem uma queratinização que fica entre 25% e 50%. Os tumores pouco diferenciados possuem pior prognóstico, pois geralmente contêm células aneuploides (aumento ou diminuição de um ou mais pares de cromossomos, mas não de todos) e metastatizam mais precocemente se comparados com as neoplasias mais diferenciadas. Possuem um grande pleomorfismo, uma queratinização menor que 25% e mitoses freqüentes (WAGMAN et al., 2003; MYERS et al., 1996, e PARISE, 2000).

Margem cirúrgica

O objetivo da cirurgia constitui na retirada da lesão deixando margens cirúrgicas satisfatórias. Recomenda-se sempre que possível, uma margem macroscópica entre 1 e 2 cm da mucosa livre da lesão. A lesão tumoral precisa ser retirada de forma segura e completa de seu sítio de origem, pois a obtenção de margens livres ao término da cirurgia possui um melhor prognóstico (PARISE, 2000). A literatura revela que 15% de todos os carcinomas de cavidade oral, 9% dos carcinomas de orofaringe, 4 % dos carcinomas de laringe e 3% dos carcinomas de hipofaringe, não são adequadamente excisados. A positividade da margem cirúrgica indica que 50% a 80% dos pacientes desenvolverão recorrência local ou demonstrarão tumor residual na re-excisão, se não houver terapia adjuvante (MYERS et al., 1996).

Tamanho do tumor

O tamanho do tumor é um dos componentes do sistema TNM de estadiamento de câncer (que será explicado no item 1.4). Onde o T corresponde ao: tumor primário; N: linfonodos regionais e M: metástase à distância. Em geral, quanto maior o tamanho do tumor pior é o prognóstico. No entanto, se o tumor for grande e a invasão da lâmina própria for superficial ele tem melhor prognóstico se comparado com um tumor pequeno e profundo (MYERS et al., 1996).

Localização

Um dos fatores que influenciam na agressividade do carcinoma espino celular é a sua localização. Cada sítio anatômico tem seu próprio padrão de disseminação e prognóstico (JOSEPH et al., 2002). Tumores que surgem em sítios visíveis ao paciente são de fácil acesso cirúrgico. Além disso, quanto maior a vascularização linfática próxima à localização do tumor pior é o prognóstico. Tumores de verdadeiras cordas vocais, localizados em áreas praticamente desprovidas de vasos linfáticos possuem um prognóstico melhor, se comparados com os tumores de laringe, base da língua e hipofaringe, localizados em áreas ricas em vasos linfáticos (MYERS et al., 1996).

Linfonodos e metástases regionais

O CEC de cabeça e pescoço é conhecido por metastatizar predominantemente para as vias linfáticas (MAULA et. al. 2003). A condição dos linfonodos regionais é o principal parâmetro para determinação do prognóstico dos pacientes no CEC de cabeça e pescoço. Ela é verificada pelo N histológico que classifica os linfonodos como: linfonodo negativo (N-), linfonodo positivo e sem ruptura capsular (N+R-), linfonodo positivo e com ruptura capsular (N+R+). O linfonodo positivo (N+R-) comparado com o negativo (N-) tem associação com pior prognóstico. Os linfonodos que exibem a ruptura capsular (N+R+), reduzem ainda mais a sobrevida, quando comparados com os linfonodos positivos que não apresentam a ruptura capsular (N+R-). A presença de apenas um linfonodo positivo e

sem ruptura capsular diminui pela metade a baixa sobrevida de 5 anos. (MYERS et al., 1996).

A presença de metástases regionais é observada em aproximadamente 30% dos pacientes no momento do diagnóstico da lesão bucal. No entanto, o sítio de origem faz com que haja variação neste percentual. Estima-se, por exemplo, que de 50 a 60% dos pacientes com CEC do trígono retromolar (um dos sítios da cavidade oral), apresentem metástases regionais já na primeira consulta médica. A freqüência da metastatização em geral é diretamente proporcional às dimensões do tumor primário. Porém, aproximadamente 25% dos pacientes que não apresentam evidência clínica de metástases regionais ao diagnóstico, poderão desenvolvê-las (MYERS et al., 1996) e (PARISE, 2000).

As metástases linfáticas locorregionais podem atingir múltiplos linfonodos cervicais (localizados na região do pescoço), os quais possuem cinco níveis. O nível I inclui os linfonodos submentonianos e submandibulares. O nível II, III, e IV inclui os linfonodos jugulares internos altos, jugulares internos médios e jugulares internos baixos, respectivamente. O nível V inclui os linfonodos da região do triângulo posterior (MYERS et al., 1996).

Os sítios primários mais envolvidos na disseminação do tumor primário para o pescoço constituem as áreas da mucosa do trato aerodigestivo superior, particularmente, orofaringe, laringe, hipofaringe e cavidade oral (MARCH e PINEDO, 2002). Indivíduos que previamente foram submetidos à cirurgia e tiveram recorrência de metástase cervical, possuem um percentual menor que 5 % de sobrevivência . Quanto mais inferior estiver o nível do linfonodo positivo (IV e V) pior é o prognóstico, por maior risco da doença metastatizar à distância (MYERS et al., 1996).

Fatores prognósticos dos linfonodos cervicais

Os fatores que mais interferem no prognóstico do CEC de cabeça e pescoço estão diretamente relacionados com os resultados do tratamento cervical, que em geral é cirúrgico. A técnica cirúrgica do esvaziamento cervical é realizada para a retirada dos linfonodos acometidos. Nesta técnica o pescoço é aberto lateralmente, a maior parte do músculo esternocleidomastóide é removido, assim como linfonodos da região cervical, a veia jugular, o nervo espinhal acessório, a glândula submaxilar e grande parte da glândula parótida. A sobrevida do paciente é influenciada pela presença de linfonodos positivos e pelo nível do linfonodo acometido. A invasão extracapsular é um fator prognóstico isolado mais importante para predizer a recidiva locorregional (PARISE, 2000).

Metástase do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço

Metástases à distância são observadas tardiamente e estima-se que ocorram em 10% a 30% dos pacientes. Os sítios mais acometidos são pulmões, fígado e ossos (especialmente vértebras, costelas e crânio). A recorrência locorregional geralmente precede metástases à distância. No entanto, entre 10% a 20% dos pacientes desenvolverão metástase à distância sem primeiro a doença recorrer locorregionalmente (MYERS et al., 1996). A literatura denomina este fenômeno como " skip metástase", pois a disseminação se desloca dos níveis cervicais de drenagem linfática altos previsíveis para os níveis mais baixos, aparecendo de início já no nível IV (PARISE, 2000).

1.4 Estadiamento do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço

O sistema TNM de estadiamento do câncer foi criado em 1982, pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e American Joint Committee on Câncer (AJCC). Este sistema constitui em uma avaliação clínica que permite desenhar estratégias de tratamento, comparar resultados e avaliar o prognóstico dos pacientes com câncer. O T refere-se ao tamanho do tumor primário, o N ao estado do linfonodo cervical e o M refere-se à presença ou ausência de metástase à distância (MYERS et al., 1996).

Os parâmetros do estadiamento são definidos por exames clínicos, testes diagnósticos e biópsias. A combinação dos parâmetros TNM identificados, sugerem que tumores menores e sem metástase cervical possuem melhor prognóstico se comparados com tumores maiores e com metástase; e que o câncer possui uma progressão lógica iniciada no sítio primário, podendo estender até pescoço para depois metastatizar à distância (MYERS et al., 1996).

A combinação da classificação T e N do sistema TNM determina os estádios, que vão de I a IV. A tabela a seguir indica estadiamento do CEC de cabeça e pescoço (PARISE, 2000).

Classificação TNM	Descrição
Tumor primário (T)	
TX	Tumor primário que não podo ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor de até 2 cm em seu maior diâmetro
T2	Tumor maior que 2 cm e menor que 4 cm em seu maior diâmetro
T3	Tumor maior que 4 cm em seu maior diâmetro
T4	Tumor maior que 4 cm com invasão de estruturas adjacentes (base da língua, musculatura profunda, cortical óssea, pele cervical, seio maxilar etc.)
Envolvimento nodal (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases regionais
N1	Metástase em linfonodo único menor ou igual a 3 cm em seu maior diâmetro
N2	Metástase em linfonodos múltiplos maiores que 3 cm e menores que 6 cm em seu maior diâmetro
N3	Metástase em linfonodo maior que 6 cm em seu maior diâmetro
Metástases à distância (M)	
Mx	Metástases à distância que não avaliáveis
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

A combinação entre T, N e M determina o estadiamento, conforme mostrado abaixo:

Nível de envolvimento N e M	Tamanho do tumor :	T0	T1	T2	T3	T4
NO MO		-	I	II	III	IV
N1 MO		III	III	III	III	IV
N2 MO		IV	IV	IV	IV	IV
		IV	IV	IV	IV	IV
M1		Com qualquer N ou T : estádio IV				

O sistema de estadiamento clínico do CEC de cabeça e pescoço é necessário, no entanto apresenta falhas por deixar de considerar outros parâmetros importantes, como por exemplo: grau de diferenciação e espessura tumoral (particularmente importante para a língua), condição nutricional e imunológica do paciente, além dos parâmetros genéticos moleculares, os quais têm sido cada vez mais estudados em câncer (MYERS et al., 1996).

As ferramentas moleculares têm mostrado que as análises histológicas falham na detecção de células neoplásicas nas margens do tumor. Vários autores estão observando alterações no gene *TP53* , por exemplo, nas margens cirúrgicas de mais da metade dos CEC de cabeça e pescoço. Estas margens cirúrgicas foram consideradas histopatologicamente livre de tumores (BRAAKHUIS et al., 2003).

1.5 Campo de Cancerização

O comportamento biológico do CEC de cabeça e pescoço faz dele uma doença heterogênea com padrão distinto de apresentação (PARISE, 2000 e SIDRANSKY et al., 2001). O aparecimento de múltiplos tumores primários (MTP) de cabeça e pescoço é um fenômeno conhecido e ocorre em 5 a 30% dos casos (PARISE, 2000). A incidência de

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

segundos tumores primários (STP) é de 10 a 35%, dependendo da localização do primeiro tumor primário e da idade do paciente (van OIJEN e SLOOTWEG, 2000).

Os MTP são definidos por critérios como: características de malignidade definidas, tumores distintos entre si e exclusão de que um tumor seja metástase do outro. Os tumores são classificados como sincrônicos, que são diagnosticados com intervalo de até 6 meses e metacrônicos, diagnosticados com intervalo superior a seis meses, podendo ocorrer no trato aerodigestivo superior, esôfago e pulmão (RAPOPORT et al., 2001). Uma das principais causas para o desenvolvimento de MTP são os eventos induzidos por carcinógenos, principalmente encontrados no hábito tabaquista. Indivíduos que são fumantes e etilistas crônicos ,podem apresentar múltiplas lesões cancerosas e precursoras (MEYER et al., 1996; van OIJEN e SLOOTWEG, 2000).

Os STP são definidos como canceres que são geograficamente separados, distintos e não conectados por modificações neoplásicas epiteliais originárias do câncer primário. A maioria dos STP ocorre na região da cabeça e do pescoço e representam uma das principais causas de morte em pacientes que apresentam lesões em estágios iniciais. Pelo menos 50% dos STP aparecem dentro do período de dois anos, a partir da terapia inicial (MYERS et al., 1996). O fenômeno da cancerização de campo tem sido freqüentemente utilizado para explicar a aparição de STP, MTP e recorrência local (BRAAKHUIS et al., 2003 e WAGMAN et al., 2003).

O conceito de cancerização de campo foi proposto em 1953 por Slaughter e colaboradores, após um estudo histológico abrangente do câncer de cavidade oral e de sua mucosa adjacente. Foram observados graus variáveis de displasia nas regiões vizinhas ao tumor invasivo. O termo cancerização de campo começou a ser utilizado após as seguintes observações: a) desenvolvimento de câncer oral em áreas multifocais proveniente de modificações de lesões pré-cancerosas; b) tecido anormal ao redor do tumor; c) câncer oral freqüentemente consiste de múltiplas lesões independentes que às vezes se agrupam; d) persistência de tecidos anormais após a cirurgia pode explicar os STP e as recorrências locais (BRAAKHUIS et al., 2003).

O fenômeno da cancerização de campo é um conceito importante relacionado à história natural do câncer de cabeça e pescoço, pois é encontrada também em lesões pré-neoplásicas como algumas leucoplasias, as quais contém alterações genéticas associadas ao câncer e por isso são consideradas como campo por definição. O fenômeno do campo de cancerização também foi descrito em câncer de pulmão, esôfago, vulva, cólon, mama, bexigas e pele (BRAAKHUIS et al., 2003 e WAGMAN et al., 2003).

Atualmente, a cancerização de campo pode ser definida em termos moleculares e sua posição no processo carcinogênico pode ser delineada. Neste contexto, tem sido utilizada para discutir modelos de progressão genética em vários tipos de canceres. Os estudos sustentam modelos de carcinogênese, nos quais existem campos de células alteradas geneticamente. Essas alterações têm sido comparadas com as anormalidades encontradas na tecido, desde seu estado hiperplásico até carcinomatoso (SIDRANSKY et al., 2001 BRAAKHUIS et al., 2003).

1.6 História natural e epidemiologia molecular do CEC de cabeça e pescoço

A história natural do CEC de cabeça e pescoço é particularmente relacionada ao seu sítio de origem e classificação TNM, que juntos constituem determinantes da agressividade da doença. A progressão da doença de atipia/displasia para carcinoma invasivo obedece a uma ordem seqüencial. Um exemplo disto é que as lesões pré-cancerizáveis, como as eritroplasias e leucoplasias, podem sofrer transformações malignas com a intensa exposição ao álcool e tabaco. A displasia é caracterizada por uma atipia celular, perda da maturação normal e estratificação epitelial. Esta é graduada como média, moderada ou grave. Na transição de displasia média à grave as anormalidades nucleares ficam mais evidentes, as mitoses se tornam mais aparentes e há um aumento da profundidade do epitélio. Mutações específicas no DNA têm sido encontradas nas etapas de progressão da doença do CEC de cabeça e pescoço (MYERS et al., 1996 e WAGMAN et al., 2003).

Nos últimos anos uma atenção especial tem sido dada para a caracterização molecular do CEC de cabeça e pescoço, com o objetivo de compreender melhor a biologia deste tipo de tumor. Os mecanismos de regulação da proliferação celular, desempenhados por proto-oncogenes e genes supressores tumorais, possuem uma ação importante na carcinogênese. Os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada e os genes supressores tumorais controlam o crescimento celular. A ação dominante dos oncogenes e a perda da função dos genes supressores tumorais por metilação, deleção ou mutação possuem uma ação importante na carcinogênese.

A evolução carcinogênica do CEC de cabeça e pescoço inclui alterações de genes supressores tumorais e oncogenes, por um evento inicial (como os hábitos do tabagismo e do etilismo crônicos, por exemplo), no epitélio caracterizado morfologicamente como hiperplásico. Essas alterações são cumulativas e transformam progressivamente o tecido hiperplásico em displasia, carcinoma in situ até carcinoma invasivo (CALIFANO et al., 1996). Especula-se que o CEC de cabeça e pescoço apareça após a ocorrência de 6 a 10 eventos genéticos independentes (GONZALEZ et al., 1995).

Os agrupamentos das modificações genéticas em cada passo do câncer do CEC de cabeça e pescoço, desde lesões pré neoplásicas até câncer invasivo, tem permitido um

modelo de progressão molecular. A figura 1 mostra a representação esquemática de alguns eventos moleculares que ocorrem no CEC de cabeça e pescoço.

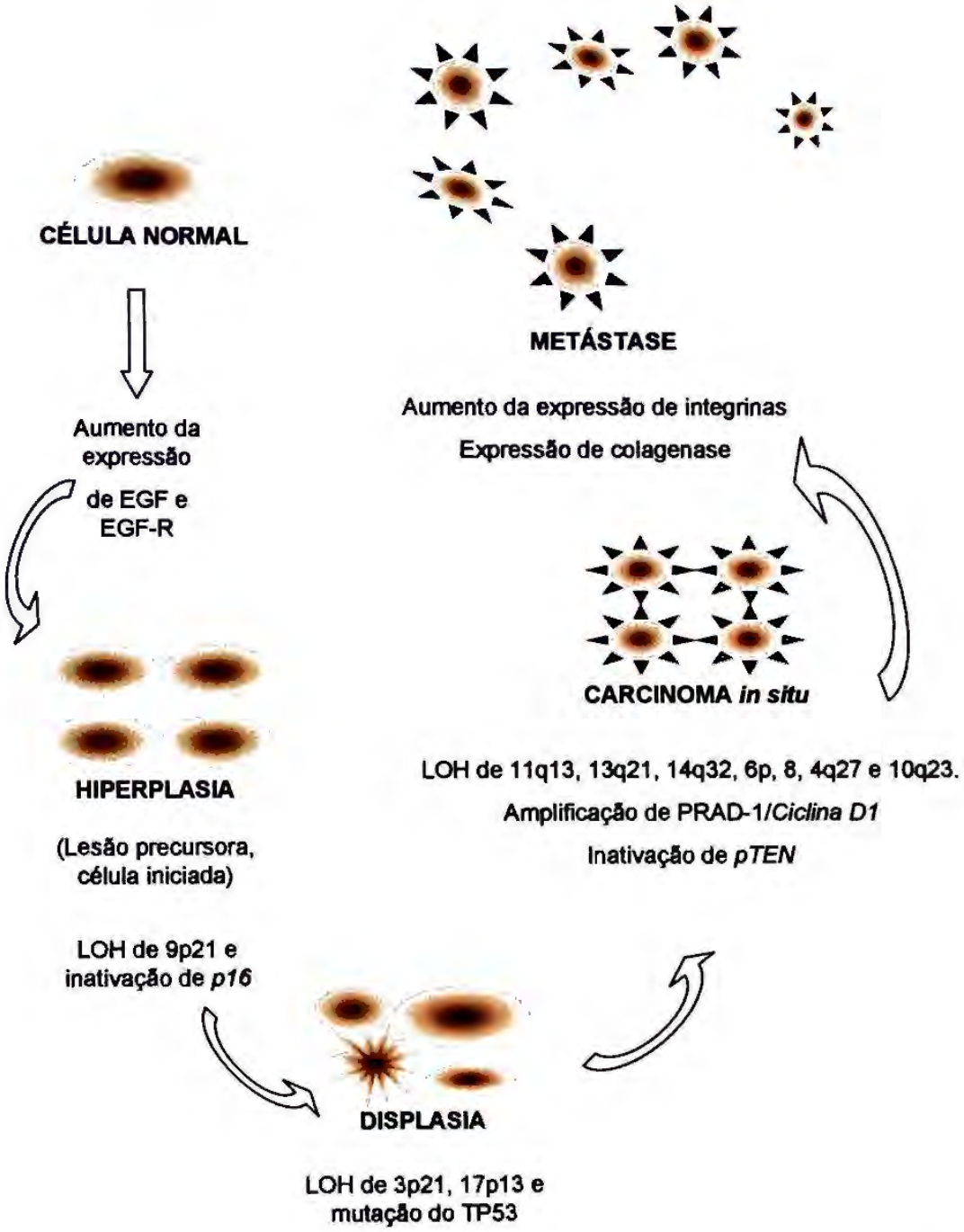


Figura1: Representação esquemática de algumas alterações moleculares que ocorrem no desenvolvimento do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço. A importância de cada alteração e a precisa seqüência de eventos não foi completamente estabelecida. No entanto, estas servem para enfatizar os múltiplos eventos moleculares que ocorrem para o estabelecimento e progressão deste tumor. Detalhes no texto. Adaptado de Sidransky et al., 2001e Myers et al., 1996.

A perda da heterozigosidade (LOH) na região 9p21 é uma das alterações genéticas mais comuns e ocorre em estágios iniciais da progressão deste tipo de tumor. O principal efeito desta perda é a inativação do gene supressor tumoral *p16*, um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) importante na regulação do ciclo celular. Na transição do epitélio hiperplásico para displásico, pode haver perda alélica do cromossomo 3p21 e 17p13. Vários estudos indicam que há múltiplos genes supressores de tumor no cromossomo 3p e que diversas deleções (nele encontradas) se associam ao CEC de cabeça e pescoço. A localização 17p13 abriga o gene supressor de tumor TP53, que é encontrado mutado em aproximadamente metade de todos os tipos de canceres (SIDRANSKY et al., 2001 e CHAKRABORTY et al., 2003).

Perdas alélicas adicionais ocorrem em fases mais avançadas do estágio de progressão da doença. Mais de 35% dos CEC de cabeça e pescoço possuem perda alélica dos cromossomos 4, 6p, 8 e 14; a região do cromossomo 13 é deletada em 27% dos casos. A região 10q23 onde se localiza o gene supressor de tumor *pTEN*, responsável pela promoção da sinalização e migração celular, se encontra envolvido nos estágios mais avançados da doença e em uma freqüência de 10% (SIDRANSKY et al., 2001).

A região 11q13 é particularmente importante, pois nesta região há o gene PRAD-1/Ciclina D 1 (que codifica para uma proteína homônima) um dos responsáveis pela transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (MYERS et al., 1996). Este gene pode ser encontrado com número de cópias aumentado em até 10 vezes, é encontrado em 36% dos casos de CEC de cabeça e pescoço e se relaciona a agressividade da doença por ativar constitutivamente o ciclo celular (MYERS et al., 1996; SIDRANSKY et al., 2001 e van OIJEN e SLOOTWEG, 2000) .

O aumento da expressão de integrinas e colagenases foi visto estar associado com o potencial de invasão do CEC de cabeça e pescoço. As diferentes expressões das integrinas $\alpha6\beta4$, $\alpha3\beta1$ e $\alpha2\beta1$ podem estar relacionadas com o potencial invasivo da linhagem de carcinoma espino celular UM-SCC-1 (ORVILLE et al., 2002). Vários estudos têm sugerido a participação de colagenases como as metaloproteinases e uroquinases ,

na invasão celular tumoral do CEC de cabeça e pescoço via controle de degradação da matriz extracelular (HASINA et al., 2003).

O gene mais estudado no CEC de cabeça e pescoço é o TP53, pois esta mutado na maioria dos casos, possui um padrão estável de mutação que é mantido durante o processo de metástase. Esta manutenção das mutações nos vários estágios da carcinogênese faz deste gene um bom marcador clonal. Isso pode ser importante, por exemplo, na diferenciação de recorrência tumoral local e STP. Além disso, o acúmulo da proteína p53 é um dos eventos mais comuns encontrados nas células do CEC (Mc WILLIAMS et al., 2000; van OIJEN e SLOOTWEG, 2000).

As alterações encontradas em oncogenes e genes supressores de tumor, bem como a perda do controle das interações de suas proteínas, constituem um exemplo da perda do equilíbrio do crescimento celular. Essas modificações podem ser decisivas para o desenvolvimento tumoral, pois envolvem proteínas sinalizadoras fundamentais para a proliferação celular, diferenciação e apoptose. Atualmente um grupo de proteínas que participam da sinalização celular, a família dos receptores de fator de crescimento do fibroblasto (FGFR), tem sido enfatizado devido à sua relevância em patologias humanas (BELLOSTA et. al., 2001). Estes receptores desempenham o papel de sinalizadores celulares, pela via das proteinoquinases.

1.7 Caracterização e função dos receptores de fator de crescimento do fibroblasto

As proteinoquinases são enzimas que transferem um grupo fosfato terminal do ATP, para um aminoácido específico de uma proteína alvo. Elas são caracterizadas em dois grupos de acordo à sua localização celular. Os receptores com atividade de proteinoquinases, que se situam na membrana celular e as proteinoquinases citossólicas, que ficam livres no citoplasma da célula. O tipo de quinase é definido pelo aminoácido que ela fosforila na proteína alvo (LEWIN, 2000). Os FGFR pertencem à família das proteinoquinases específicas de tirosina, constituindo receptores transmembrânicos envolvidos na sinalização celular, via interação com a família dos fatores de crescimento do fibroblasto, os FGF (TERADA et al., 2001).

Os FGF possuem mais de vinte membros conhecidos, os quais participam de atividades celulares diversas como proliferação e diferenciação. Possuem função importante durante a embriogênese, e originam várias células mesenquimais e neuroectodermais (BELLOSTA et al., 2001).

Os FGFR interagem com os FGF para modularem suas atividades. Os FGFR possuem quatro membros na família, os quais compartilham uma estrutura conservada em um nível de homologia de 56-71% em suas seqüências primárias, (HART et al., 2000). Seus genes estão distribuídos em diferentes cromossomos, que são codificados por quatro genes: *FGFR1* encontra-se no cromossomo 8, o *FGFR2* localiza-se no 10, o *FGFR3* no 4 e o *FGFR4* no 5 (ARMSTRONG et al., 1992).

Os genes *FGFR1, FGFR2 FGFR3*, sofrem processamento alternativo e geram várias isoformas. No entanto, o *FGFR4* codifica um único receptor (EZZAT et al., 2001). Estes receptores possuem diferentes ligantes e distribuições teciduais (DICKSON et. al., 2000). A organização estrutural dos *FGFR* é a mesma e a principal diferença entre eles consiste no número de tirosinas que podem ser fosforiladas (KLINT et al., 1999).

A estrutura destes receptores é dividida em três partes: uma porção extracelular com três domínios similares à imunoglobulinas, uma porção transmembrânica simples e um domínio de quinase específico de tirosina, dividido em duas porções no citoplasma celular (TERADA et al., 2001). A molécula de heparan sulfato é imprescindível para a ação transdutora de sinais destes receptores. A transdução de sinal é iniciada com a ligação do FGF nos FGFR em conjunto com o heparan sulfato, formando desta maneira um complexo ternário (DICKSON et al., 2000). A **figura 2**, mostra a estrutura do FGFR com essas interações.

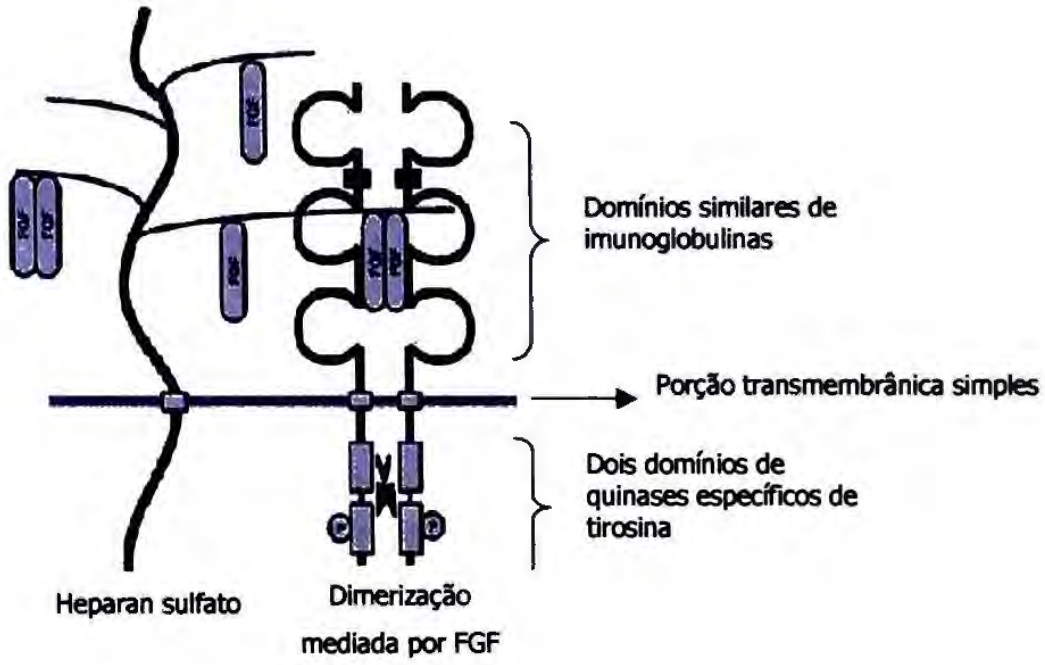


Figura 2: Representação do complexo ternário formado por FGFR, FGF e heparan sulfato. Breast Cancer Res. 2000; 2 (3): 191–196

A estimulação autócrina pela co-expressão de FGF e FGFR na mesma célula leva a transformação celular e a ativação constitutiva de FGFR ,via mutação ou rearranjo. Isso tem como conseqüência , a uma proliferação celular descontrolada (JEFFERS et al., 2001). Mutações somáticas nos genes humanos dos FGFR2 e FGFR3, foram encontradas em carcinomas de bexiga, cervical e colo-retal (BANGE et al., 2002). Em uma variedade de canceres, particularmente mama, o *FGFR1* e o *FGFR4* foram encontrados amplificados (DICKSON et al., 2000).

A sinalização aumentada dos FGF pode levar a uma variedade de alterações. Foram encontrados alterados em inúmeras patologias como: tumores, retinopatia em diabetes, doença de Alzheimer´s, distrofia muscular de Duchenne e arteriosclerose (BOILLY, et al., 2000 e HUGHES et al., 1997).

Vários estudos relacionados ao câncer têm sido realizados com o gene *FGFR4*. Foi visto que este gene medeia a ondulação da membrana das células do carcinoma de mama podendo, desta maneira, estar envolvido com a motilidade celular em câncer (Xie et al., 1999); estimula a proliferação de células eritróides, participa do desenvolvimento de tumor pituitário (SHUNJIANG et al., 2002) e envolve-se nos eventos tardios da carcinogênese de células beta murinos, em experimentos *in vitro* (CAVALLARO et al., 2001).

Recentemente foi encontrado um alelo do gene *FGFR4*, que foi denominado pelos pesquisadores de FGFR4 Arg^{388}. O alelo FGFR4 Arg^{388} contém um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que ocorre quando apenas um nucleotídeo é trocado no códon . A mudança do nucleotídeo guanina pelo adenina (G → A) no códon 388 do alelo FGFR4 Arg^{388} tem como conseqüência a substituição do aminoácido glicina (GGG) pelo arginina (AAG), representados pelas letras letras G e R respectivamente (BANGE et al., 2002 e JÉZÉQUEL et al., 2004).

O alelo FGFR4 Arg^{388} que possui a substituição G388R, apresenta-se em aproximadamente 50% da população humana e é inócuo em indivíduos saudáveis. Entretanto, foi visto que pode predispor pacientes portadores de câncer, a uma progressão significativamente acelerada da doença. Em câncer de mama foi associado com a diminuição da sobrevida livre de doença e em câncer de cólon, com metátases linfonodais e metátases linfonodais avançadas. A freqüência de sua distribuição é de 58 % para alelos homozigotos Gli-Gli, 31,5% para alelos heterozigotos Gli-Arg e 10,5 % para alelos homozigotos Arg-Arg. A distribuição deste polimorfismo foi descrita em câncer de mama na Rússia (Gli-Gli 44%, Gli-Arg 48% e Arg-Arg 11%), na Alemanha (Gli-Gli 47%, Gli-Arg 42% e Arg-Arg 11%) e no câncer de colon na Itália (Gli-Gli 45%, Gli-Arg 46% e Arg-Arg 9%) (BANGE et al., 2002).

Fatores associados ao CEC de cabeça e pescoço continuam sendo estudados para uma melhor compreensão do tumor. Considerando que: a condição dos linfonodos regionais é o principal parâmetro para determinação do prognóstico dos pacientes no CEC de cabeça e pescoço, que ao diagnóstico a presença de metástases regionais é muito comum e que aproximadamente 25% dos pacientes que não apresentam evidência clínica

de metástases regionais ao diagnóstico poderão desenvolvê-las, a investigação da associação do alelo FGFR4 Arg^{388} com a diminuição da progressão desta doença, mostrou-se interessante.

Até o presente momento, não há estudos que demonstrem o impacto do alelo FGFR4 Arg^{388} em câncer de cabeça e pescoço.

Além de auxiliar eventualmente no prognóstico, a importância do estudo das proteinoquinases de membrana em câncer é que estas constituem alvos candidatos para o desenho de drogas. Estas atuariam na intervenção da sinalização destes receptores por abordagens que utilizam anticorpos monoclonais, inibidores de moléculas ATP, imunotoxinas e olionucleotídeos anti-senso (ZWICK et al., 2002 e ROSÉE et al., 2002). Medicamentos como Herceptina e Gleevec já disponíveis comercialmente, interferem na ação patológica das proteinoquinases e constituem ferramentas importantes na terapia contra o câncer de mama e leucemia mielóide crônica, respectivamente (BANGE et al., 2002).

Neste trabalho pretendemos estudar a possível implicação do alelo FGFR4 Arg^{388} na progressão e baixa sobrevida dos indivíduos portadores de CEC de cabeça e pescoço, em amostras provenientes de espécimes anatomopatológicos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi correlacionar os dados clínicos de 75 pacientes portadores de CEC primário de cabeça com a incidência do alelo FGFR4 Arg^{388} , para que pudesse ser possível a verificação do seu impacto no prognóstico desta doença.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Os pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço incluídos neste estudo foram acompanhados pela mesma equipe cirúrgica no período de 1996 à 2001. As amostras foram predominantemente no Hospital Sírio Libanês e os pacientes não receberam tratamento clínico prévio. O tipo de material analisado proveio de espécimes anatomopatológicos armazenados sob a forma de blocos de parafina ou lâminas com secções de 3 μm espessura. Foram incluídos 75 pacientes portadores de CEC comprovados por biópsia neste estudo. Setenta e três pacientes foram investigados quanto a presença do alelo FGFR4 Arg388. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras - Hospital Sírio Libanês e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP.

Características da população estudada

A idade variou de 22 a 89 anos com média de 59,8 anos, 61 indivíduos do sexo masculino e 14 do feminino. A localização do tumor primário foi em 29 pacientes (43,2%) cavidade oral, 12 (17,9%) orofaringe, 18 (26,9%) laringe e 8 (11,9%) hipofaringe. Em termos de tratamento, 65 dos 75 pacientes foram submetidos a cirurgia para o tumor primário e 71 submetidos a esvaziamentos cervicais. A histologia das lesões primárias mostrou margens adequadas (tumor primário ou esvaziamento) em 53 (70,7 %) das peças, exígua ou comprometida em 13 (17,3%) e não informada em 9 (12%); em termos de diferenciação foram considerados bem diferenciados 20 (26,7 %), moderadamente diferenciados 38 (50,7%) e pouco diferenciados 16 (21,3%); A histologia dos esvaziamentos resultou em 29 (38,7 %) N-, 20 (26,7 %) N+R-, 22 (29,3%) N+R+.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do DNA

Testar 3 metodologias foi necessário, principalmente para os materiais provenientes das lâminas, pois estas continham 2 tipos de fixadores e o aderente organo silano. As secções dos espécimes anatomopatológicos provenientes das lâminas, tinham uma espessura de 3 μm e foram removidas por raspagem, com bisturi estéril descartável Feather número 11 (Feather Safety Razor CO.,LTD. Medical Division). As raspagens 5 lâminas fixadas com formol tamponado ou com ácido formol acético Carlo Erba, foram utilizadas para avaliar os três protocolos de extração de DNA testados, quanto a obtenção de ácido nucleico de qualidade. O mesmo foi feito para as amostras provenientes dos blocos de parafina, que possuíam 20 μm de espessura. Os métodos utilizados foram detalhados e a descrição segue-se abaixo.

3.2.2 CHELEX-100

Este método utiliza a resina Chelex-100, na extração. As proteínas são aderidas na resina e o ácido nucleico pode ser separado na fase superior, após a adição do clorofórmio na amostra.

As secções provenientes dos blocos e a raspagens das lâminas foram colocadas em tubos eppendorfs de 1,5 ml. Adicionou-se a este tubo 1 ml de Tris-EDTA Tween-20 0,5% (50 mM de Tris, 1mM de EDTA e 0,5% de Tween-20 pH 8.0). Após esta etapa, as amostras foram submetidas a um aquecimento de 30 segundos à uma potência de 60 W, no microondas. Uma centrifugação de 10 minutos à 13.000 RPM foi aplicada aos tubos, que foram colocados no gelo até a formação de um botão de parafina. O botão de parafina formado no sobrenadante, foi retirado com pipeta juntamente com o tampão. As amostras foram lavadas 2 vezes com álcool 70% e a centrifugação de 10.000 RPM foi realizada entra as etapas. Após a etapa de lavagem, nos tubos contendo as secções de 20 μm, foram adicionados 480μl do tampão Tris-EDTA Tween-20 e 10mg/ml da enzima

proteinase K. Nos tubos contendo o material proveniente das lâminas, foram adicionados 240µl do tampão Tris-EDTA Tween-20 e 5mg/ml da enzima proteinase K. A digestão do material ocorreu *overnight* à 56 °C em banho Maria. Para a etapa de purificação do ácido nucleico, nos tubos que continham as secções de 20 µm utilizou-se 250 µl de Chelex-100 à 5% em Tris-EDTA (50 mM de Tris, 1mM de EDTA) e 250 µl de clorofórmio. Para as amostras provenientes das lâminas utilizou-se 100 µl de Chelex-100 à 5% em Tris-EDTA (50 mM de Tris, 1mM de EDTA) e 100µl de clorofórmio, na etapa de purificação. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e a fase superior foi estocada à - 20°C.

3.2.3 Kit Nucleon HT para tecidos duros da Amersham Life Science.

Este método utiliza a resina Nucleon na extração. As proteínas são aderidas na resina, que fica na intérfase e o ácido nucleico fica na fase superior. A execução desta metodologia foi conforme as instruções do fabricante.

3.2.4 Fenol-Cloroformio-Alcool-Isoamílico (FCAI)

Tem como princípio ser solvente orgânico.

Para a etapa de retirada da parafina adicionou-se 1ml de xilol em cada tubo, os quais ficaram por 20 minutos à 80 °C. O material foi centrifugado por 5 minutos à 7500 RPM, novamente foi adicionado xilol e as amostras foram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente. A etapa de lavagem foi realizada com sucessivas etapas, as quais foram adicionadas 1 ml de: etanol à 100%, 75%, 50%, 25% e água bidestilada. As etapas de lavagem do material foram intercaladas, com centrifugação de três minutos à 13200 RPM e o sobrenadante sempre foi descartado. Após a etapa de retirada da parafina. Nos tubos que continham secções de 20 µm foram adicionados 480 µl do tampão Tris-EDTA Tween-20 e 10 mg/ml da enzima proteinase K. Nos tubos que continham as raspagens das lâminas foram digeridos com 240 µl de Tris-EDTA Tween-20 e 5 mg/ml da enzima proteinase K. A digestão do material ocorreu *overnight* à 56 °C, em banho Maria. A purificação iniciou-se com a adição de 200µl de FCAI (25:24:1) e 200µl de Tris-EDTA

Tween-20500µl de FCAI (25:24:1), homogeneização por 5 minutos e centrifugação de 13.200 RPM por três minutos. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 200µl de FCAI aos tubos, que foram novamente homogeneizados e centrifugados por cinco minutos à 13.200 RPM. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo; a ele adicionou-se para precipitação: 50µl de acetato de sódio 3 M, 1 ml de etanol absoluto. Após esta etapa, as amostras foram submetidas a um vórtex vigoroso e incubadas por 5 minutos no gelo seco. Após uma centrifugação de 30 minutos à 4 °C o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou à temperatura ambiente até secar complemente. Após esta etapa o material foi ressuspenso em 50 µl de água bidestilada e estocado a – 20° C.

3.2.5 Avaliação integridade do DNA

Após a extração, realizou-se uma eletroforese com o tampão TAE 1x (40 mM de Tris-Acetato, 1mM de Na2EDTA, pH 8.0), em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, de 5µl de amostra e 1µl do tampão de corrida blue dextran (Invitrogen), para verificar a integridade do DNA extraído.

3.2.6 Eficácia dos métodos de extração do ácido nucleico

A eficácia dos métodos foi avaliada com a amplificação do exon 3 do gene hMSH2, que possui 380 pares de bases, pela técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Cerca de 300ng de DNA (extrato dos espécimes anatomopatológicos) foram amplificados com os *primers* : *sense* GCT TAT AAA ATT TTA AAG TAT GTTC e *anti-sense* GCC TTT CCT AGG CCT GGA ATC TCC, em uma solução com volume final de 50µl, contendo: 25 pmol de cada primer; 200 mM de desoxinucleosídeos (dAPT, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 mM $MgCl_2$; 1x tampão da enzima, 2UI Taq polimerase e água deionizada e bidestilada autoclavada até completar o volume de 50µl. O material para amplificação do exon 3 do gene hMSH2 foi submetido ao seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94 °C 30 segundos, anelamento e extensão à 58 °C de 30 segundos, e um ciclo final de extensão de 10 minutos a 72 °C. A reação de PCR foi realizada em um termociclador automático (no termociclador GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). O resultado da

amplificação foi verificado no fotodocumentador Image Master VDS, Pharmacia Biotech, após eletroforese à 120 V em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio., utilizando-se o tampão TAE 1X.

3.2.7 Protocolo de seqüenciamento do gene hMSH2

Uma amostra extraída com FCAI foi seqüenciada para verificar a integridade do DNA extraído das lâminas de parafina. O equipamento utilizado foi o seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer). O produto de PCR foi purificado e submetido à reação de seqüenciamento utilizando o kit de seqüenciamento Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer), empregando a AmpliTaq DNA polimerase. Utilizou-se o *primer sense*.

3.2.8 PCR-RFLP do exon 9 do *FGFR4*

A técnica de PCR-RFLP é utilizada na identificação de polimorfismos ou mutações que determinam a alteração do padrão de clivagem, devido a substituições pontuais em sítios de restrições, obtidos a partir de uma determinada região do DNA. O alelo FGFR4 Arg^{388} identificado recentemente mostrou-se interessante para este trabalho, devido o CEC de cabeça e pescoço possuir um percentual significativo de metastatizar locorregionalmente.

3.2.9 PCR do exon 9 do *FGFR4*

Cerca de 50 ng de DNA proveniente dos espécimes anatomopatológicos e de sangue periférico. O sangue periférico foi utilizado como controle da reação de PCR, pois o DNA extraído deste material é mais preservado do que os provenientes dos espécimes anatomopatológicos. A amplificação ocorreu conforme BANGE e colaboradores (2002) com, *primer sense*: GAC CGC AGC AGC GCC CGA GGC CAG e *anti-sense* AGA GGG AAG AGG GAG AGC TTC TG. Em uma solução com volume final de 25 µl, contendo: 0,6 pmol de cada primer; 6 mM de desoxinucleosídeos (dAPT, dCTP, dGTP, dTTP); 3,0 mM $MgCl_2$; 1x tampão da enzima, 1UI Taq polimerase e água deionizada e bidestilada autoclavada até completar o volume de 25 µl. O material para amplificação do gene *FGFR4* foi submetido ao seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de desnaturação de 5

minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 95° C 30 segundos, anelamento e extensão à 57° C de 30 segundos, e um ciclo final de extensão de 10 minutos a 72° C. A reação de PCR foi realizada em um termociclador automático (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). O resultado da amplificação foi verificado no fotodocumentador Image Master VDS, Pharmacia Biotech, após eletroforese à 120 V em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, utilizando-se o tampão TAE 1X. A reação de PCR gerou um fragmento de 168 pares de bases. O resultado da amplificação foi verificado no fotodocumentador Image Master VDS, Pharmacia Biotech, após eletroforese à 120 V em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, utilizando-se o tampão TAE 1X.

3.2.10 RFLP (digestão) do exon 9 do gene *FGFR4*

O fragmento de 168 pares de bases foi submetido a uma incubação de 12 horas com a enzima de restrição *Bst*N1 (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão enzimática o alelo FGFR4 Gli^{388} foi caracterizado por fragmento com tamanhos de: 109, 37 e 22 pares de bases; o alelo FGFR4 Gli/Arg^{388} foi caracterizado pela presença dos fragmentos de 109, 82, 37, 27 e 22 pares de bases e o alelo FGFR4 Arg^{388}, foi caracterizado pelos fragmentos de 82, 37, 27, 22 pares de bases. A eletroforese utilizou Gene Phor (Pharmacia Biotech), o Kit GeneGel Clean 15/24 (Pharmacia Biotech), que forneceu um gel não desnaturante na concentração de 15% de acrilamida sem glicerol; as instruções do fabricante foram seguidas. O resultado da amplificação foi verificado no fotodocumentador (Image Master VDS, Pharmacia Biotech).

3.2.11 Seqüenciamento do exon 9 do gene *FGFR4*

O seqüenciamento das amostras foi realizado com o seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer). O produto da PCR que flanqueou a região do códon do gene *FGFR4* foi submetido à reação de seqüenciamento, utilizando o kit de seqüenciamento Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer). A AmpliTaq DNA polimerase (enzima modificada com igual afinidade para cada dNTP, que serve para aumentar a especificidade da reação) foi empregada nesta reação. O primer anti-sense foi utilizado para esta finalidade.

A reação de seqüenciamento para o gene FGFR4 (região do códon 388) foi realizada com um volume final de 10 µl. Os reagentes e concentrações utilizados foram: Primer: 1,6pmol, Big Dyes em concentrações de 1x e 1 µl do produto da PCR nas bandas com alta intensidade e 5 µl, nas bandas menos intensas. A reação foi completada com água bidestilada até atingir o volume final de 10 µl.

O material foi submetido ao seguinte protocolo de reação de seqüenciamento: 1 ciclo de desnaturação de 2 minutos à 96 °C, seguido de 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação à 96° C, 10 segundos de anelamento à 50° C e 4 minutos de extensão à 60° C.

3.3 Análise estatística

As curvas de sobrevida foram obtidas pelo método Kaplan-Meier e as diferenças na sobrevida entre subgrupos foram avaliadas pelo Log-Rank. Para verificar o efeito de diversas variáveis ao mesmo tempo utilizou-se o Modelo de Regressão de Cox. O software utilizado foi SPSS v12 e diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Extração de DNA

Optou-se em princípio, pela comparação dos métodos de extração de DNA para posterior aplicação nas amostras de interesse. Isso se fez necessário pois a obtenção de ácido nucleico de qualidade, dos materiais provenientes dos espécimes anatomopatológicos, constitui uma etapa crítica que pode interferir em etapas posteriores. Como o tipo e o tempo de fixação podiam interferir na extração de DNA, testes com os dois fixadores utilizados nas amostras provenientes das lâminas, foram feitos. As raspagens 5 lâminas fixadas com formol tamponado ou com ácido formol acético Carlo Erba, foram utilizadas para avaliar os três protocolos de extração de DNA testados (todas as amostras provenientes das lâminas continham o aderente organo silano). A eficácia dos métodos de extração foi testada com a amplificação do exon 3 do gene hMSH2, que gerou um fragmento de 380 pares de bases. As secções dos blocos de parafina, que possuíam 20 μm de espessura, também foram testadas.

4.1.2 Resultados e análise dos métodos testados para extração de DNA com CHELEX-100 5%

O protocolo CHELEX-100 5% testado na extração de DNA foi o conforme COOMBS N.J. et. al., 1999. Segundo referência o método era rápido, de baixo custo e permitia a obtenção até do RNA com sucesso nas amostras provenientes de bloco de parafina. Nas amostras armazenadas em lâminas esta técnica mostrou-se ineficaz. Várias modificações foram testadas neste protocolo, porém quando os testes para amplificação pela técnica de PCR eram feitos, nunca reproduziam os mesmos resultados e na maioria das vezes a reação para a amplificação do exon 3 do gene hMSH2, não ocorria. Em uma das tentativas, por exemplo, apenas no experimento 6 **figura 3**, foi obtido sucesso. Isso pode ter ocorrido possivelmente por permanência de resíduos dos blocos de parafina, que poderiam interferir na reação. As amostras provenientes dos blocos de parafina com secção de espessura de 20 μm, tiveram resultados excelentes com este protocolo, na amplificação do *FGFR4*, região do códon 388 (**figura 8**). Neste tipo de material (proveniente dos blocos) este foi o método de extração de DNA utilizado.

4.1.3 Resultados e análise dos métodos testados para extração de DNA com Kit Nucleon HT para tecidos duros da Amersham Life Science

O método não foi adequado para as amostras armazenadas em lâminas, pois foi obtido sucesso na amplificação apenas quando 18 lâminas fixadas com Carlo Erba foram utilizadas, portanto não é recomendado para materiais escassos, **figura 4**. Esta metodologia mostrou-se eficaz na obtenção de ácido nucleico proveniente dos espécimes anatomopatológicos armazenados em blocos de parafina (dados não mostrada) . No entanto, é mais trabalhosa e custosa se comparada com o protocolo de extração CHELEX-100 5%.

4.1.4 Resultados e análises dos métodos testados para extração de DNA com Fenol-Clorofórmio-Álcool-isoamílico (FCAI)

O melhor dos 3 métodos foi o que utilizou FCAI, pois amplificou as amostras a partir da raspagem de 5 lâminas, com reprodutibilidade do resultado. Nestas amostras, esta metodologia demonstrou eficácia apenas quando a precipitação ocorreu *overnight* à –70°C. No presente momento utiliza-se gelo seco por 5 minutos para agilizar a extração **figura 5**. A metodologia mostrou-se igualmente eficaz nas amostras provenientes dos blocos de parafina .

Avaliação da eficácia dos métodos de extração do ácido nucleico, pela amplificação do gene Hmsh2

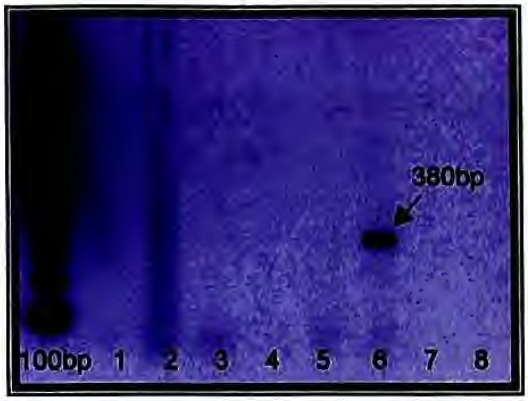


Figura 3: Extração realizada com Chelex-100 à 0.5%.

•O número de 1: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 2: raspagem com 6 lâminas; 3: raspagem com 9 lâminas; 4: raspagem com 18 lâminas.
• Do número 1 ao 4 as lâminas foram fixadas em ácido formol acético Carlo Erba.
•O número de 5: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 6: raspagem com 6 lâminas; 7: raspagem com 9 lâminas; 9: raspagem com 18 lâminas.
• Do número 5 ao 8 as lâminas foram fixadas em formol tamponado.

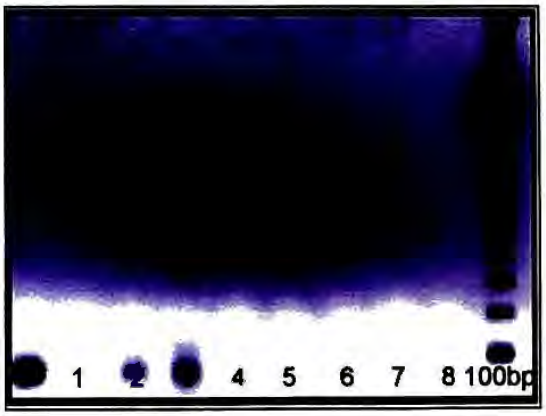


Figura 4: Kit Nucleon HT para tecidos duros da Amersham Life Science

•O número de 1: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 2: raspagem com 6 lâminas; 3: raspagem com 9 lâminas; 4: raspagem com 18 lâminas.
• Do número 1 ao 4 as lâminas foram fixadas em ácido formol acético Carlo Erba.
•O número de 5: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 6: raspagem com 6 lâminas; 7: raspagem com 9 lâminas; 9: raspagem com 18 lâminas.
• Do número 5 ao 8 as lâminas foram fixadas em formol tamponado.

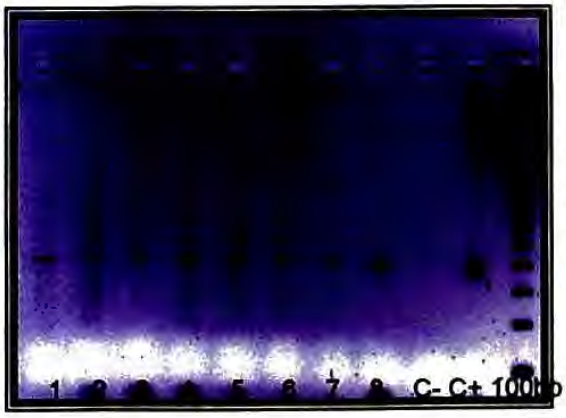


Figura 5: Fenol-Clorofórmio-Álcool-isoamílico

O número de 1: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 2: raspagem com 6 lâminas; 3: raspagem com 9 lâminas; 4: raspagem com 18 lâminas.
Do número 1 ao 4 as lâminas foram fixadas em ácido formol acético Carlo Erba.
O número de 5: representa a extração por este método, com raspagem de 3 lâminas; 6: raspagem com 6 lâminas; 7: raspagem com 9 lâminas; 9: raspagem com 18 lâminas.
Do número 5 ao 8 as lâminas foram fixadas em formol tamponado. C-: sem DNA das três extrações testadas; C+: amostra que previamente havia sido amplificada, das três extrações testadas

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

4.1.5 Integridade do gel

A **figura 6**, ilustra as diferenças da integridade do DNA obtido na extração em amostras de espécimes anatomopatológicos e sangue periférico, respectivamente, extraídos com FCAI.

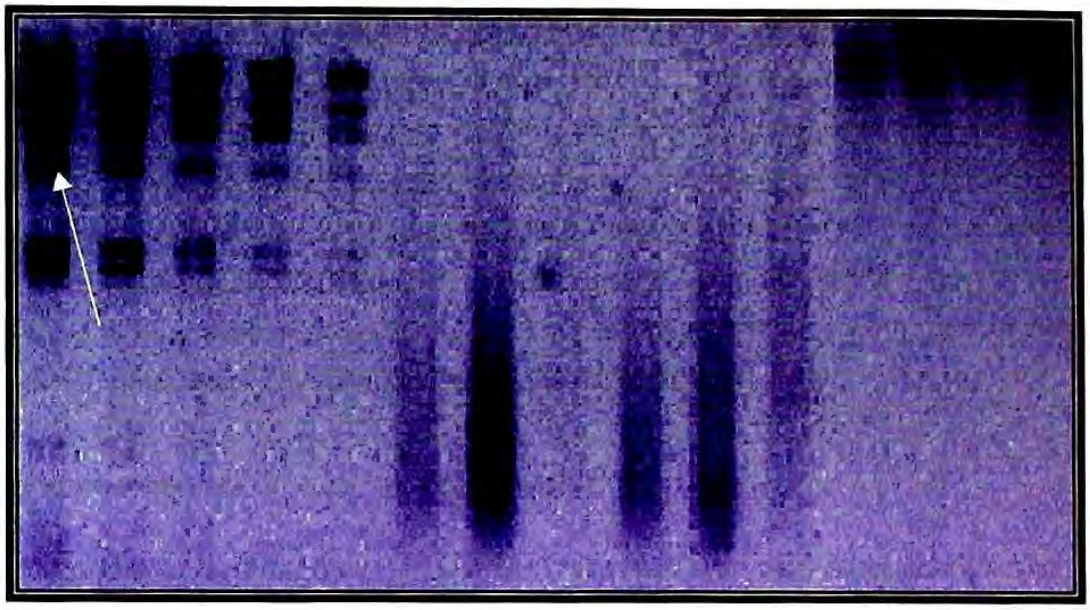


Figura 6 : representa a integridade do DNA obtido na extração com FCAI em amostras de espécimes anatomopatológicos (1 a 6) e amostras de sangue periférico (7 a10).

Esta foto evidencia claramente a degradação do DNA proveniente dos espécimes anátomopatológicos e a integridade do DNA de sangue periférico. O marcador λ *Hind* foi utilizado para quantificar as amostras e a quarta banda foi utilizada para esta finalidade de A a E, as concentrações são de: 500 nanogramas (ng), 250ng, 125ng, 62,25ng, 31,12ng, respectivamente.

4.1.6 Avaliação da eficácia dos métodos de extração do ácido nucleico, pela amplificação do gene Hmsh2.

Amplificações pela técnica de PCR do exon 3 do gene hMSH2, foram realizadas para verificar a viabilidade da amplificação gênica nas amostras provenientes dos espécimes anatomopatológicos. Este experimento, que o laboratório já havia padronizado, foi testado nos três métodos de extração de DNA escolhidos. O fragmento gerado nesta amplificação foi de 380 pares de bases um tamanho perto do limite para amplificações provenientes de espécimes anatomopatológicos, segundo SHIBATA e colaboradores (1994). O controle positivo foi uma amostra extraída de bloco de parafina, que já havia sido testada com sucesso na reação de PCR. O controle negativo serviu para detectar eventuais contaminações. Resultados mostrados nas **figuras 3, 4 e 5**.

4.1.7 Seqüenciamento do exon 3 do gene hMSH2

O seqüenciamento do exon 3 do gene hMSH2 foi testado em alguns espécimes extraídos com FCAI e com Chelex-100 á 0.5%. para verificar a aplicação desta técnica neste tipo de amostra. Logo na primeira tentativa um excelente resultado foi observado, conforme mostra figura 7. A abordagem do seqüenciamento foi previamente testada, para confirmar os casos duvidosos da PCR-RFLP do alelo FGFR4 Arg388. Os eletroferogramas possuem a letra correspondente acima e todas puderam ser perfeitamente identificadas. Isso indica uma boa reação, o que torna as amostras provenientes dos espécimes elegíveis a esta ferramenta.

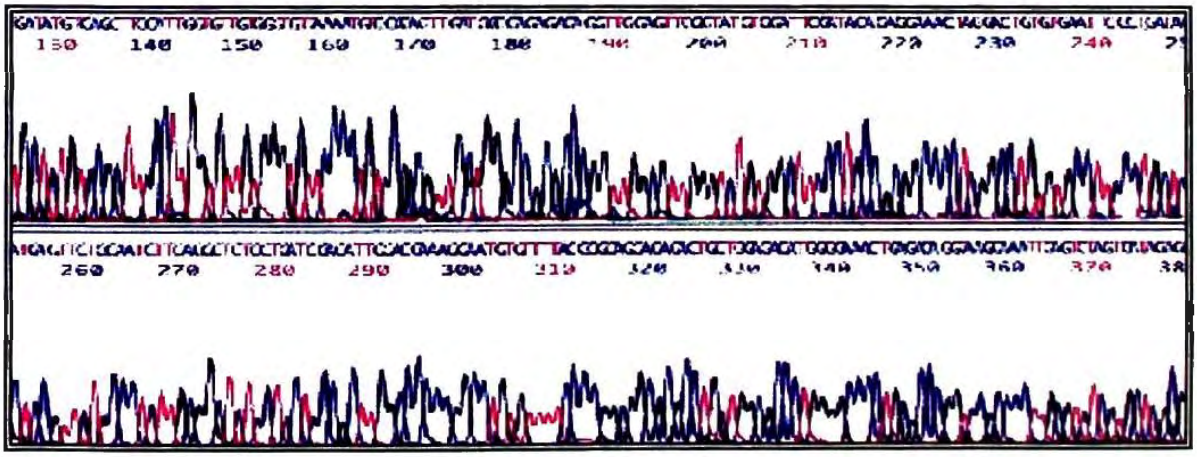


Figura 7 : seqüenciamento do exon 3 do gene hMSH2 do DNA proveniente de espécime anatomopatológico estraído com F-C-A-I.

4.1.8 PCR do alelo FGFR4 Arg^{388} (exon 9)

Os amplicons gerados com a reação de PCR para o exon 9, região do **alelo FGFR4** Arg^{388} foram de 168 pares de bases. A reação de PCR foi obtida com sucesso e nenhuma alteração precisou ser realizada em suas concentrações originais de reagentes. A **figura 8**, mostra a amplificação bem sucedida dos espécimes anatomopatológicos. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de sangue periférico.

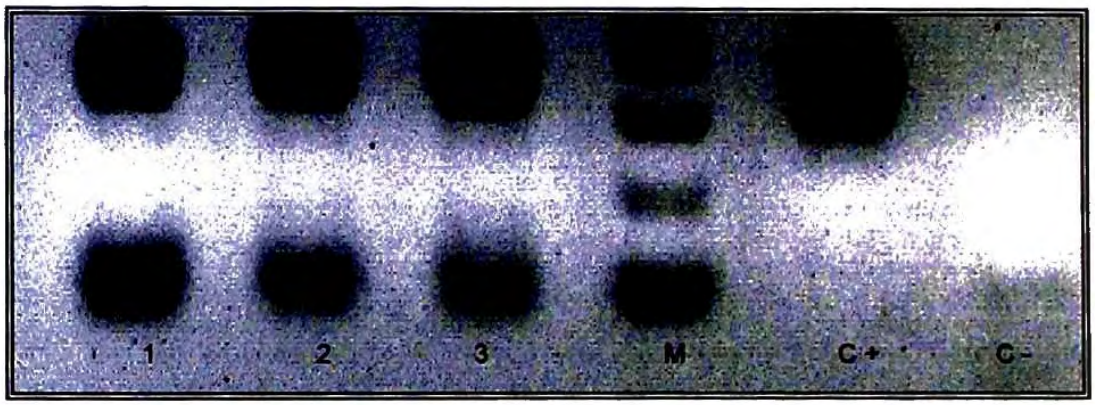


Figura 8: Eficácia da amplificação do fragmento onde há o SNP, **alelo FGFR4** Arg^{388}. Colunas **1, 2 e 3** são amostras provenientes dos espécimes anatomopatológicos. O **C+** da reação teve a utilização da amplificação de uma amostra proveniente de sangue periférico. O **C-** é o controle de contaminação da reação de PCR, sem DNA. **M**, representa marcador de peso molecular de 50 pares bases.

4.1.9 RFLP do exon 9, alelo FGFR4 Arg^{388}

O alelo FGFR4 Arg^{388} foi caracterizado pela presença de dois fragmentos distintos de 82 e 27 pares de bases. A digestão do alelo normal (Gli^{388}) gerou um fragmento de 109, 37 e 22 pares de bases. A reação de digestão foi obtida com sucesso, conforme demonstra **figura 9**.

4.1.9 RFLP do alelo FGFR4 Arg^{388}

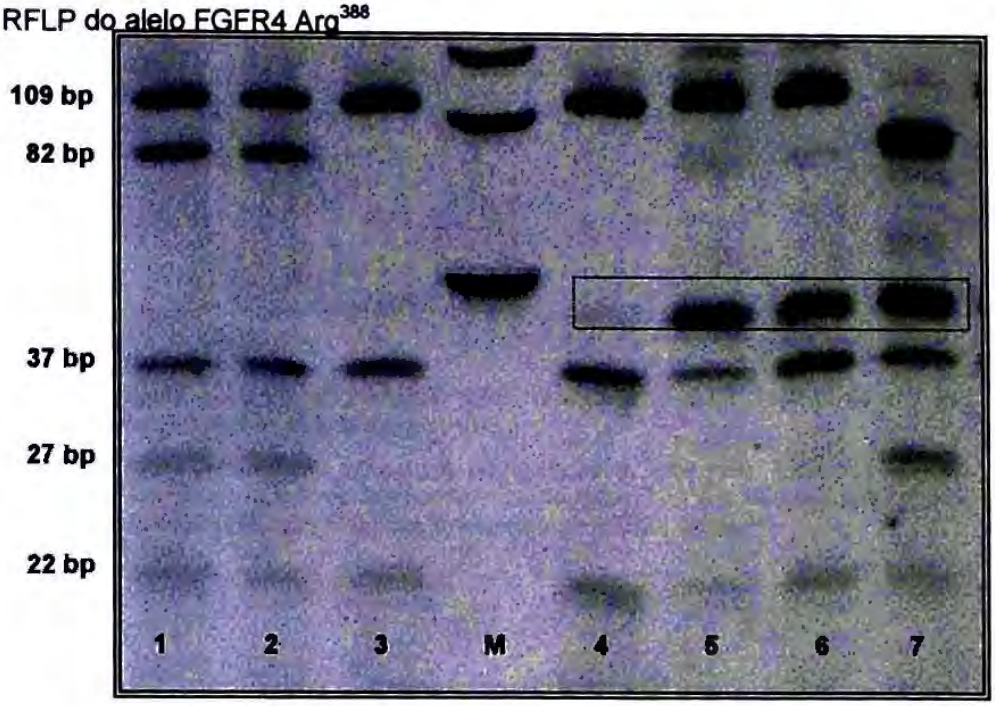


Figura 9: RFLP do exon 9, alelo FGFR4 Arg^{388}. Digestão, com a enzima de restrição *Bsf*N1, do fragmento de 168 pares de bases obtido da PCR. As colunas 1, 2, representam o padrão de digestão de indivíduos heterozigotos para o alelo FGFR4 Gli/Arg^{388}, que gerou os fragmentos de 109, 82, 37, 27 e de 22. As colunas 3, 4, 5 e 6 representam os padrões de digestões das amostras normais que geram fragmentos de 109 bp, 37 bp e 22 bp. A coluna 7 representa o padão de homozigose o qual não há a banda de 109 pares de bases. A região tracejada representa os dímeros de primers os quais não interferem na reação. **M**, representa o marcador de 50 pares de bases.

4.1.10 Seqüenciamento do exon 9, alelo FGFR4 Arg^{388}

Esta técnica foi aplicada quando havia dúvida na PCR-RFLP. Amostras onde a banda de 87 pares de bases, aparecem fracas no gel de acrilamida. Esta banda fraca foi seqüenciada e identificada como normal. Sua presença em algumas amostras foi identificada como sendo uma inespecificidade do produto de PCR. Isto ocorreu devido a alta sensibilidade do gel e da coloração utilizada. As **figuras (10; 10 A), (11;11 A)** e **(12; 12 A),** mostram o padrão de seqüenciamento do alelo FGFR4 Gli/Arg^{388}, FGFR4Arg^{388} e FGFR4Gli^{388}, respectivamente.

4.1.10 Seqüenciamento do exon 9,

alelo FGFR4 Arg[388]

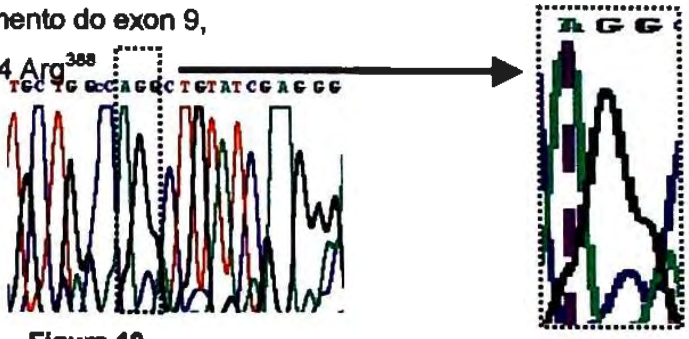


Figura 10 Figura 10 A

Figura 10: Eletroferograma do sequênciamento do alelo FGFR4 Arg[388], que possui o padrão de heterozigose Gli / Arg.

Figura 10A: Região aumentada da figura 10. A linha roxa tracejada indica o aumento do pico que representa o nucleotídeo A e sua sobreposição com o nucleotídeo G, caracterizando a heterozigose FGFR4 Gli/Arg[388].

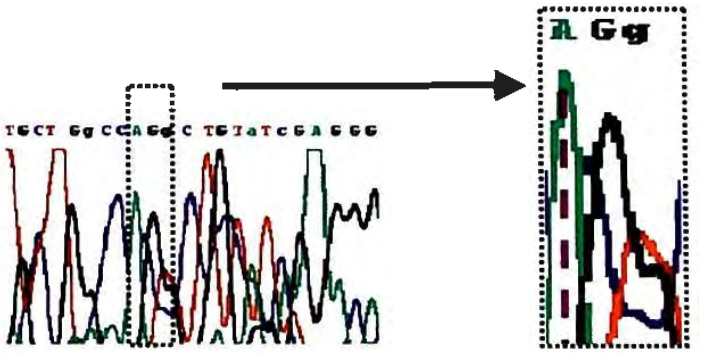


Figura 11 Figura 11A

Figura 11: Eletroferograma do sequênciamento do alelo FGFR4 Arg[388], que possui o padrão de homozigose Arg / Arg.

Figura 11A: Região aumentada da figura 11. A linha roxa tracejada indica o aumento do pico que representa o nucleotídeo A, que não sobrepõe-se com o nucleotídeo G, caracterizando e homozigose FGFR4 Arg[388].

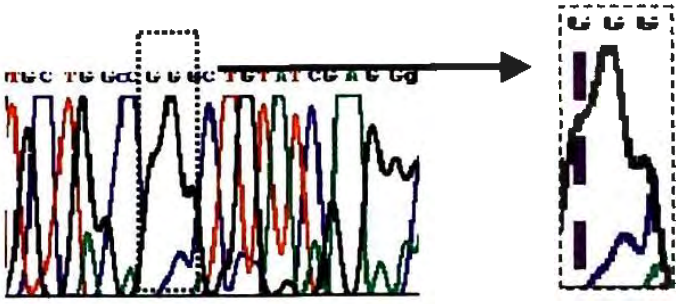


Figura 12 Figura 12 A

Figura 12: Eletroferograma do sequênciamento do alelo do FGFR4 Arg[388], que possui o padrão normal Gli / Gli.

Figura 12 A: Região aumentada da figura 28, que identifica o alelo FGFR4 Gli[388]. A linha roxa tracejada indica o pico que representa G. Não há aumento do pico do nucleotídeo A.

4.2 Análise estatística

O estudo foi realizado em 75 pacientes com portadores de CEC de cabeça e pescoço. A analise estatística foi feita com o software SPSS v12.

4.2.1 Estatística Descritiva

Inicialmente foi realizada a análise descritiva dos dados, através das quais podemos conhecer as características estatísticas das variáveis envolvidas no estudo. Estas características foram apresentadas em forma de tabelas ou gráficos, onde, nas tabelas, foram utilizadas as freqüências relativas (percentuais) das classes de cada variável qualitativa e a freqüência absoluta (N). As tabelas de freqüência estão apresentadas abaixo e elas representaram as bases para a análise de sobrevida, que foi realizada pelo teste de Kaplan-Méier e Log-Rank.

Sexo (tabela 1)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	Feminino	14	18.7	18.7	18.7
	Masculino	61	81.3	81.3	100.0
	Total	75	100.0	100.0	

Tu Primário (tabela 2)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	Outros	65	86.7	86.7	86.7
	Hipofaringe	10	13.3	13.3	100.0
	Total	75	100.0	100.0	

Estagio Clínico (tabela 3)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	stage I	2	2.7	2.7	2.7
	stage II	7	9.3	9.3	12.0
	stage III	24	32.0	32.0	44.0
	stage IV	42	56.0	56.0	100.0
	Total	75	100.0	100.0	

N Histológico (tabela 4)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	N -	29	38.7	40.8	40.8
	N +	42	56.0	59.2	100.0
	Total	71	94.7	100.0	
Missing	Não aplicável	4	5.3		
	Total	75	100.0		

Margem Cirúrgica (tabela 5)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	suficiente	53	70.7	80.3	80.3
	insuficiente	9	12.0	13.6	93.9
	exígua	4	5.3	6.1	100.0
	Total	66	88.0	100.0	
Missing	missing	9	12.0		
	Total	75	100.0		

Diferenciação (tabela 6)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	pouco	16	21.3	21.6	21.6
	moderado	38	50.7	51.4	73.0
	bem	20	26.7	27.0	100.0
	Total	74	98.7	100.0	
Missing	missing	1	1.3		
	Total	75	100.0		

Invasão Perineural (tabela 7)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	ausente	39	52.0	58.2	58.2
	presente	28	37.3	41.8	100.0
	Total	67	89.3	100.0	
Missing	ignorado	8	10.7		
	Total	75	100.0		

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Adjuvancia (tabela 8)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	radio	37	49.3	50.0	50.0
	qt+rxt	15	20.0	20.3	70.3
	não	22	29.3	29.7	100.0
	Total	74	98.7	100.0	
Missing	ignorado	1	1.3		
	Total	75	100.0		

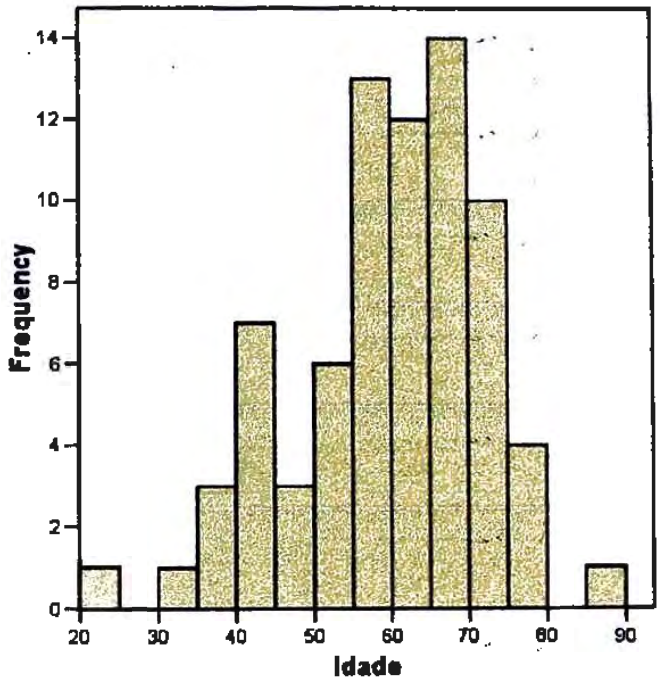
FGFR4 (tabela 9)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	gli-gli	42	56.0	57.5	57.5
	gli-arg	27	36.0	37.0	94.5
	arg-arg	4	5.3	5.5	100.0
	Total	73	97.3	100.0	
Missing	ignorado	2	2.7		
	Total	75	100.0		

Gli-Gli vs. X-Arg (tabela 10)

		Freqüências	Percentuais	Percentuais Validos	Percentuais Cumulativos
Validos	gli-arg ou arg-arg	31	41.3	42.5	42.5
	gli-gli	42	56.0	57.5	100.0
	Total	73	97.3	100.0	
Missing	ignorado	2	2.7		
	Total	75	100.0		

4.2.2 Histograma de idade



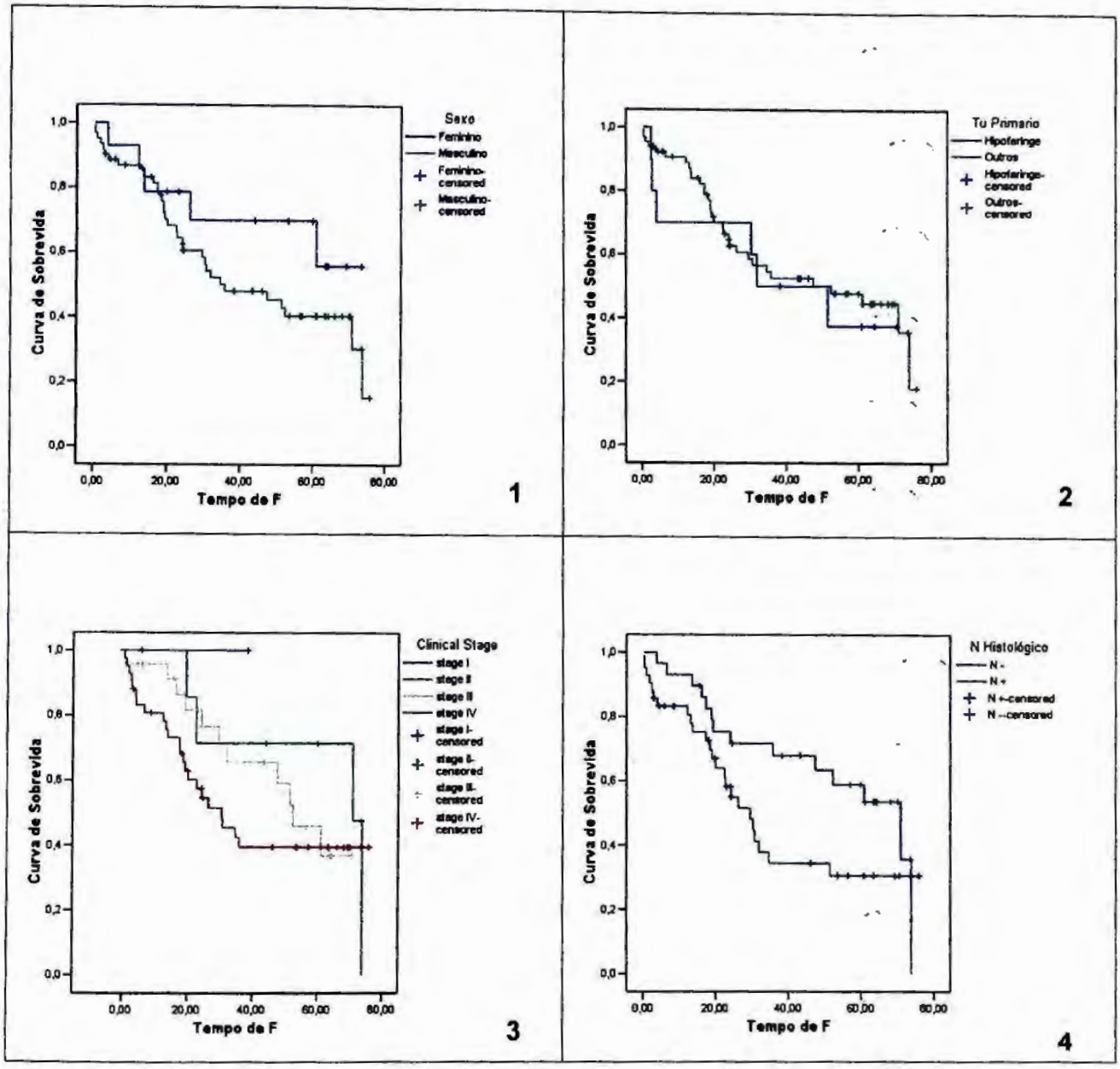
O histograma de idade mostra a média de idade da população estudada, que foi de 59 anos.

4.2.3 Gráficos de Sobrevivência e Respectivos Testes de Log-Rank

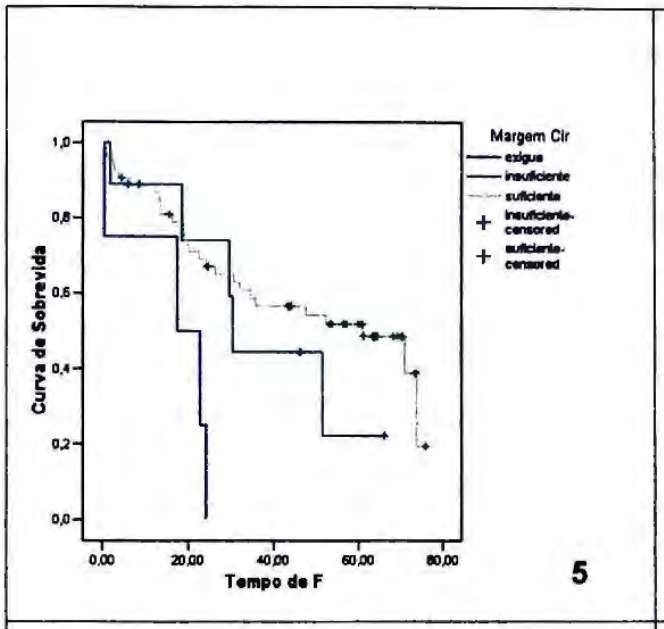
Para avaliar a influência de alguma variável foram construídas curvas de Kaplan- Méier para cada categoria destas variáveis e a comparação para verificar se uma ou outra categoria pode aumentar ou não a chance de sobrevida, foi utilizado o teste de Log-Rank. Os resultados dos testes estão apresentados na tabela 11.

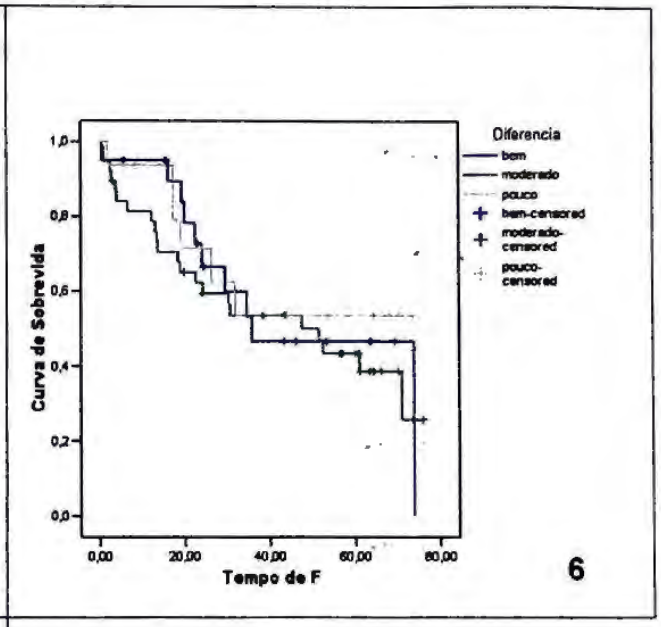
BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

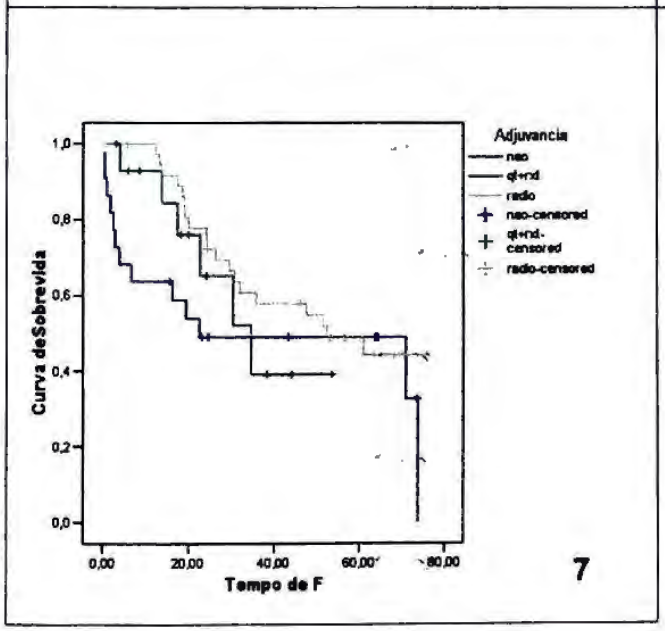
4.2.4 Curvas de Kaplan-Méier e teste de Log-Rank



O gráfico 1 representa a curva de sobrevida relacionada ao sexo da população estudada. A linha azul representa as mulheres e identifica que houve uma sobrevida maior neste grupo em relação aos homens representados pela linha verde. No entanto, a tabela 11 mostra que essa diferença não foi estatisticamente significante. **Gráfico 2**: representa o tumor de hipofaringe. Este foi o único sítio tumoral realizado separadamente, pois há uma tendência a metastatização precoce nesta localização que poderia interferir com a análise do estudo. No entanto, conforme mostra a tabela 11, não houve significância estatística na sobrevida, na análise univariada do sítio tumoral. **Gráfico 3**: Mostra que quanto maior o estadiamento (III e IV) menor a sobrevida. **Gráfico 4**: Ilustra que indivíduos que possuem um acometimento ganglionar (representado por verde) tem sobrevida mais baixa se comparados com os indivíduos que não possuem glânglio acometido.



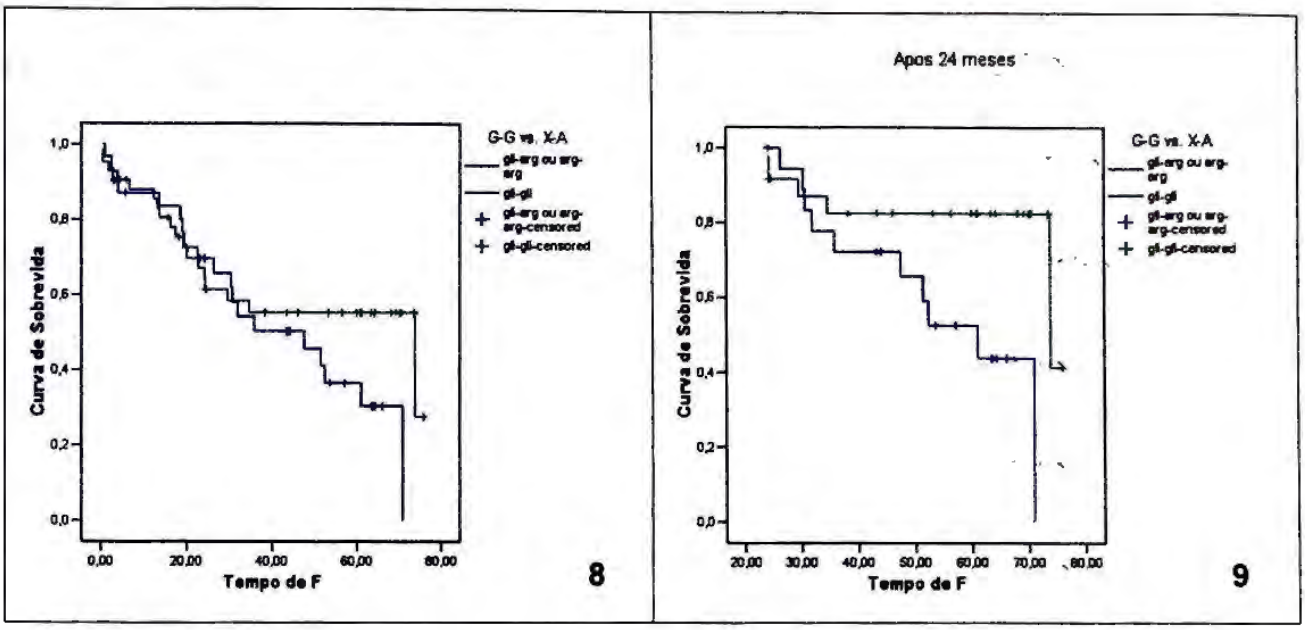




O gráfico 5: representa a curva de sobrevida relacionada à margem cirúrgica. Indivíduos que possuem margem cirúrgica suficiente possuem uma sobrevida maior se comparados com indivíduos que possuem margens cirúrgica insuficiente. A pior sobrevida foi identificada nos individuos que possuem exíguas, mínimas.

Gráfico 6: Representa a sobrevida por diferenciação. Curiosamente os indivíduos que possuiam lesões pouco diferenciadas, pior prognóstico, tiveram uma maior sobrevida (linha dourada). A pior sobrevida foi identificada nos indivíduos que possuiam tumores moderadamente diferenciados. Para este gráfico a análise estatística não mostrou significância, conforme mostra tabela 11.

Gráfico 7: lustra que indivíduos que não receberam adjuvancia tiveram sobrevida menor em relação aos que receberam tratamento auxiliar.



O gráfico 8: Representa a curva de sobrevida dos indivíduos em relação a presença do alelo FGFR4 Arg^{388}, onde G-G representa oalelo FGFR4 Gli^{388} e X-A representa FGFR4 Gli/Arg^{388} e FGFR4 Arg^{388}. A linha verde indica uma maior sobrevida dos pacientes portadores do alelo FGFR4 Gli^{388} em relação a FGFR4 Gli/Arg^{388} e FGFR4 Arg^{388}. **Gráfico 9:** representa o gráfico 8 após 24 meses de seguimento; indicando que a presença do alelo FGFR4 Arg^{388} tem um valor prognóstico importante na sobrevida.

Tabela 11: Resultado do teste de Log-Rank aplicado na análise univariada

Gráfico de Referência	Variáveis	Significância do Teste (p-value)
Gráfico 1	Sexo (masculino, feminino)	0,2160
Gráfico 2	Tumor Primário (hipofaringe, outros)	0,6802
Gráfico 3	Estádio Clinico (I, II, III, IV)	0,5170
Gráfico 4	**N Histológico (N-, N+)**	**0,0742**
Gráfico 5	**Margem Cirúrgica (exígua, insuficiente, suficiente)**	**0,0123**
Gráfico 6	Diferencia (bem, moderada, pouca)	0,6940
Gráfico 7	Adjuvancia (radio, QT+rxt, não)	0,4188
Gráfico 8	Gli-Gli versus X-Arg (g-g, g-a ou a-a)	0,2122
Gráfico 9	**Gli-Gli versus X-Arg Após 24 meses (g-g, g-a ou a-a)**	**0,0213**

4.2.5 Regressão de Cox

A análise apresentada nas seções anteriores (teste de Log-Rank), apenas avalia o efeito isolado de cada variável, sem levar em consideração a influência das demais variáveis. Pensando em verificar o efeito, ao mesmo tempo de diversas variáveis, foi utilizado o

modelo de Regressão de Cox. A vantagem deste modelo é que ele verifica a importância de uma variável, levando em consideração a influência de outras.

Como o número de variáveis era muito grande, foram utilizadas para este modelo, apenas as variáveis que já apresentaram significância estatística na análise univariada (teste de Log-Rank), as que apresentaram alguma tendência (p>0,05 e p<0,10).

Tabela 12: Variáveis utilizadas para a análise multivariada.

		Freqüências
N Histológico	0=N -	28
	1=N +	33
Margem Cirurgica	1=suficiente	50
	2=insuficiente	7
	3=exígua	4
Adjuvancia	1=radio	34
	2=QT + rxt	6
	3=não	21
G-G vs. X-A	0=gli-arg ou arg-arg	24
	1=gli-gli	37

Tabela 13: Resultados do modelo de Regressão de Cox.

		Coeficiente B	Significância p-value.	Risco Relativo Exp(B)	Intervalo de Confiança (95.0%)	
					Mínimo	Maximo
N Histológico	N +	1.480	**0.002**	**4.392**	1.711	11.270
Margem Cirurgica	suficiente		0.002			
	insuficiente	0.407	0.442	1.502	0.533	4.235
	exígua	2.539	**0.000**	**12.663**	3.158	50.771
Adjuvancia	Radio		0.011			
	QT + rxt	-0.578	0.365	0.561	0.161	1.956
	não	1.376	**0.004**	**3.957**	1.557	10.059
G-G vs. X-A	gli-arg ou arg-arg	0.781	**0.037**	**2.184**	1.048	4.550

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Interpretação dos coeficientes da análise multivariada realizada por Regressão de Cox

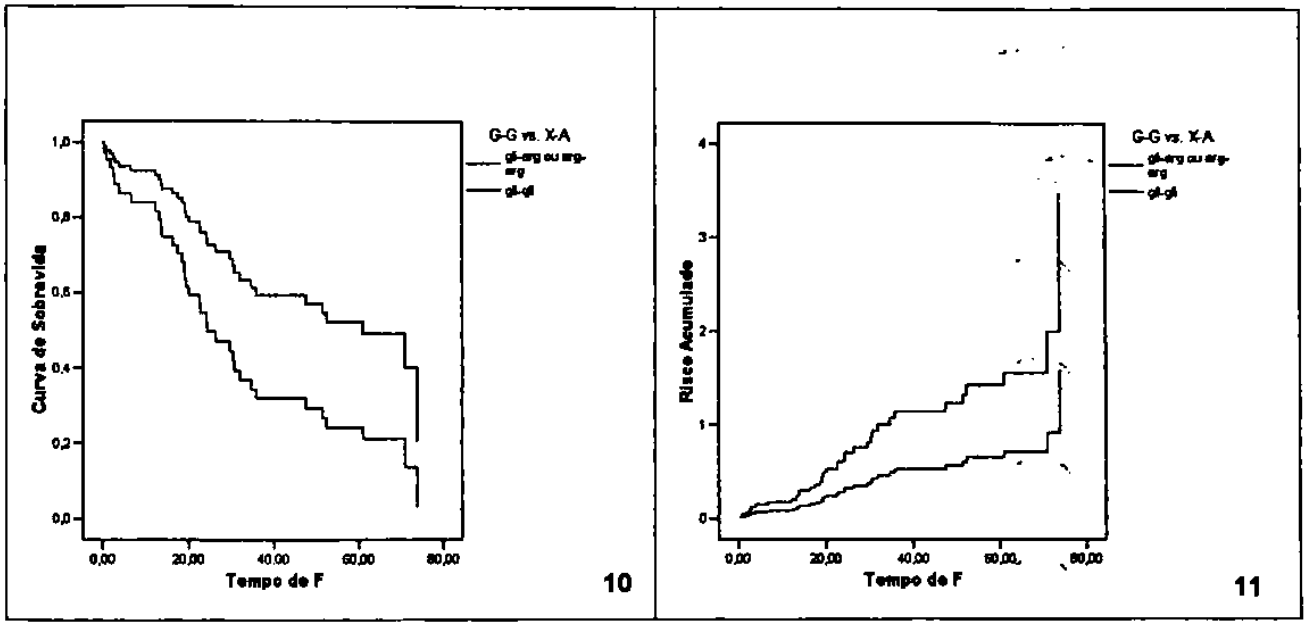
- Pacientes com N histológico positivo (gânglio acomatido) têm 4,39 vezes mais chance de óbito do que os pacientes com N histológico negativo;

- Pacientes com Margem cirurgica exígua tem 12,66 vezes mais chance de óbito do que os paciente com Margem cirúrgica suficiente;

- Pacientes sem adjuvancia tem 3,96 vezes mais chance de ter óbito do que os pacientes que recebem radioterapia ou radio-quimioterapia;

- Os pacientes portadores do alelo FGFR4 Arg^{388} ou FGFR4 Gli/Arg^{388} (representados nos gráficos por X-A), têm 2,18 vezes mais chance de óbito se comparados com os pacientes portadores do alelo FGFR4 Gli^{388} (representado no gráficos por G-G).

4.2.6 Função de sobrevida e risco acumulado



Gráficos 10 e 11: Acima são mostradas as funções de Sobrevida (esquerda), e Risco Acumulado (direita), preditas pelo modelo de Cox, para dois casos possíveis da covariável relativa ao alelo FGFR4. Aqui há duas variáveis fixas representadas por 1: FGFR4 Gli^{388} (representado por G-G) e 2: FGFR4 Gli/Arg^{388} ou FGFR4 Arg^{388} (representado por X/A). Os valores das outras covariáveis do modelo correspondem com seus respectivos valores médios (ver tabela 14).

Tabela 14: Valores médios das Covariáveis

Variáveis	Valor médio
N Histológico (N+)	0.541
Margem Cir (insuf.)	0.115
Margem Cir (exígua)	0.066
Adjuvancia (QT+rxt)	0.098
Adjuvancia (não)	0.344
G-G vs. X-A (X-A)	0.393

5. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O carcinoma espino celular de cabeça e pescoço é um tumor que apresenta uma sobrevida baixa, pois geralmente é diagnosticado em fase avançada. O tratamento desta doença ainda é predominantemente cirúrgico e neste aspecto nas últimas décadas houve pouca evolução. Outros parâmetros além da classificação TNM tem sido utilizados, como uma tentativa de melhorar o monitoramento clínico dos pacientes. Um destes parâmetros são as análises moleculares com uso crescente na área médica e que dão suporte para o entendimento de doenças complexas como o câncer.

O interesse clínico na pesquisa de fatores prognósticos gerados pela abordagem molecular, consiste na possibilidade de modulação do comportamento biológico dos tumores. Neste contexto, os polimorfismos genéticos, especialmente os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido estudados para investigar a susceptibilidade individual em relação à agressividade de várias doenças, sensibilidade ás drogas e efeito do tratamento (BRAZELL et al., 2001 e KIRK et al., 2002).

Vários estudos com SNP foram realizados para verificar o comportamento biológico de tumores. AMEYAW e colaboradores (2002), por exemplo, identificaram que o polimorfismo que substitui o aminoácido valina por uma leucina no códon 655 no protooncogene HER 2 (também conhecido como erbB-2 ou neu) predispõe a um risco maior para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres jovens. Outro estudo foi realizado pela equipe de IUGHETTI (2001), na qual identificaram que o polimorfismo D104N, no gene da endostastina, que predispõe ao desenvolvimento de tumores malignos da próstata.

Além de constituir um determinante biológico, os polimorfismos e SNPs também podem definir respostas às drogas, principalmente se estiverem relacionados às enzimas que as metabolizam. Estas podem agir diminuindo o metabolismo de algumas drogas ou aumentando os riscos de efeitos colaterais. Neste tipo de abordagem, os polimorfismos e SNPs mais estudados estão nos genes: citocromo P450, CYP2D6, CYP2C19, CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1, genes da glutationa S-transferase GSTM1 e GSTT1 (BRAZELL et al., 2002).

Neste contexto é que surgiu a justificativa para este estudo, pois (BANGE et al., 2002 e MARIMOTO et al., 2003) identificaram que o SNP (G→A) que substitui uma glicina por uma arginina no códon 388 do gene FGFR4, constitui um fator prognóstico para o câncer de mama, cólon e sarcomas de tecidos moles e é inócuo em indivíduos saudáveis. Recentemente, o estudo Embora o estudo realizado por Jézéquel e colaboradores (2004) não encontrou relevância do alelo FGFR4 Arg^{388}, no prognóstico do câncer de mama, contrariando estudos anteriores. Estudos em outros tipos de tumor ou a verificação de resultados obtidos por (BANGE et al., 2002 e MARIMOTO et al., 2003) não foram ainda descritos.

A presença do alelo FGFR4 Arg^{388} foi verificada mediante a utilização da PCR-RFLP e seqüenciamento. A escolha das metodologias adequadas para a obtenção do ácido nucleico foi a principal responsável pela viabilidade deste estudo, pois permitiu a aplicação das ferramentas utilizadas com sucesso em todas as amostras, apesar da baixa integridade do DNA proveniente dos espécimes anatomopatológicos.

As lesões que foram estudadas representaram a realidade de nosso meio, pois a maioria dos pacientes apresentava estadiamento avançado. O que é esperado já que esta doença é típica de países em desenvolvimento e leva com ela todo o efeito desta característica como por exemplo, falta de informação, acesso médico precário, subavaliação médica e desnutrição.

Este estudo teve como objetivo correlacionar os dados clínicos de 75 pacientes portadores de CEC primário de cabeça com a incidência do alelo FGFR4 Arg^{388} , para que pudesse ser possível a verificação do seu impacto no prognóstico desta doença. O modelo da doença é aplicável para esta análise e até o presente momento não há publicações indicando a relevância do alelo FGFR4 Arg^{388} neste tipo de câncer.

A distribuição do alelo tem sido estimada na freqüência de 58 % para FGFR4 Gli^{388} (alelos homozigotos Gli-Gli), 31,5% para FGFR4 Gli/Arg^{388} (alelos heterozigotos Gli-Arg) e 10,5 % para FGFR4 Arg^{388} (alelos homozigotos Arg-Arg). A distribuição deste alelo foi descrita em câncer de mama na Rússia (Gli-Gli 44%, Gli-Arg 48% e Arg-Arg 11%), na Alemanha (Gli-

Gli 47%, Gli-Arg 42% e Arg-Arg 11%) e no câncer de cólon na Itália (Gli-Gli 45%, Gli-Arg 46% e Arg-Arg 9%) (BANGE et al., 2002).

A freqüência de distribuição dos alelos encontrada na presente pesquisa foi de 56% homozigotos FGFR4 Gli^{388} (42 pacientes), 36% para heterozigotos FGFR4 $Gli\text{-}Arg^{388}$ (27 pacientes) e 5,3% para homozigotos FGFR4 Arg^{388} (4 pacientes). O grupo do homozigoto FGFR4 Arg^{388}, por ter sido identificado em um baixo número de amostras, foi analisado com os heterozigotos FGFR4 $Gli\text{-}Arg^{388}$. A distribuição do alelo na população deste estudo ficou mais próxima da italiana e alemã.

O alelo FGFR4 Arg^{388} mostrou correlação com a baixa sobrevida dos pacientes portadores de CEC primário de cabeça e pescoço, neste estudo. Este resultado sugere que este SNP é um fator prognóstico também neste tipo de câncer, além de cólon, mama e sarcoma de tecidos moles (BANGE et al., 2002 e MARIMOTO et al., 2003). A análise multivariada identificou que os parâmetros mais implicados foram: acometimento ganglionar (N histológico), margem cirúrgica exígua, pacientes sem adjuvância. e a presença do alelo FGFR4 Arg^{388}.

As possíveis interações bioquímicas serão abordadas para tentar explicar estes efeitos na população estudada. A interação dos ligantes de FGFR, podem mediar vários tipos de respostas em um microambiente, entre elas: adesão celular, degradação de matriz extracelular, angiogênese e interação com proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG); que serão discutidas a seguir.

A interação do alelo FGFR4 Arg^{388} pode ocorrer via receptores de FGFR com moléculas de adesão. CAVALLARO e colaboradores mostraram em ensaios com ratos transgênicos (Rip 1 Tag 2), que a adesividade matriz-célula do carcinoma de células β pancreáticas parece depender da sinalização de FGFR4 induzida pela molécula de adesão N-CAM. Outra molécula de adesão, a caderina-N, foi identificada como um dos componentes envolvidos na complexa via de sinalização das células β pancreáticas, formando a tríade N-CAM/FGFR/caderina-N. Neste mesmo modelo, os pesquisadores verificaram que a perda da função da N-CAM promoveu a formação de metástase predominantemente ao linfonodo local.

O aumento no número de linfonodos com doença disseminada foi detectado no estudo realizado por BANGE e colaboradores, que verificou o impacto da presença do alelo FGFR4 Arg^{388} no câncer de cólon. Desta maneira, o fenótipo FGFR4 Arg^{388} pode estar relacionado com um pior prognóstico nos pacientes com câncer, por romper um possível complexo de sinalização existente entre as moléculas de adesão e FGFR4 (CAVALLARO et al., 2001 e BANGE et al., 2002). Isso ocorre pois a substituição do aminoácido glicina (de carga neutra) pelo aminoácido arginina (carregado positivamente), no domínio transmembrânico do FGFR4, ocasiona mudança conformacional do receptor.

O rompimento das vias de controle das moléculas de adesão constituem uma hipótese para a ação do FGFR4 Arg^{388}. No entanto, as vias de estímulos de enzimas que degradam matriz extracelular também poderiam explicar o comportamento biológico mais agressivo deste alelo. Em pacientes com câncer, o controle da expressão destas enzimas pode ser mediado via FGFR e seu ligantes.

Os FGFRs, os HSPG, as integrinas e as propriedades biomecânicas do microambiente extracelular podem modular a resposta migratória das células, induzidas por FGF (BOILLY et al., 2000).

O FGF-2 se liga aos FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 e regula a expressão das colagenases (ex. metaloproteinases), ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), receptor de uPA (BIKFALVI et al, 1997). Estas moléculas podem estar envolvidas no fenótipo maligno do câncer, pois participam do remodelamento fisiológico e patológico da matriz extracelular, bem como da degradação desta necessária para a migração das células e angiogênese. (BOILLY et al., 2000)

A motilidade celular é um processo requerido para a invasão local, intrainvasão, extrainvasão de células tumorais e angiogênese. Estudos *in vitro* revelaram que a linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-231, mostrou uma motilidade reduzida em ensaios de migração nas células que expressavam o alelo FGFR4 Gli^{388} (em homozigose) em relação às células que expressavam o alelo FGFR4 Arg^{388}. A motilidade diminuída do

alelo FGFR4 Gli^{388} parece estar relacionada com o aumento da adesividade celular (BANGE et al., 2002).

Vários estudos sugerem que as hidrolases que degradam múltiplos componentes da membrana basal, como uPA e as colagenases (como as metaloproteinases), têm função na promoção da invasão celular tumoral, via sua capacidade de controlar a degradação da matriz extracelular. Essas enzimas foram descritas no envolvimento da progressão do CEC de cabeça e pescoço (BOYD et al., 1999).

Além disso, os estímulos angiogênicos desencadeados por FGF-2, quando descontrolados, também podem influenciar no fenótipo invasivo do câncer. Os surgimentos de novos microvasos podem contribuir com o crescimento tumoral e também permitir que células tumorais entrem na corrente sangüínea e metastatizem (DELLACONO et al., 1997).

A angiogênese tumoral geralmente ocorre em um ambiente hipóxico e estimula a liberação de FGF-2 pelos macrófagos. O FGF-2 também pode ser liberado por processos como morte celular, injúria química e cicatrização. O CEC de cabeça e pescoço é um conhecido tumor hipóxico e o aumento de FGF-2 e de seus receptores foi identificado neste tipo de tumor (DELLACONO et al., 1997 e BEASLEY et al., 2001).

Além de participar da adesão celular, degradação de matriz extra celular e angiogênese o alelo FGFR4 Arg ^{388} pode interagir com HSPG.

A modificação conformacional da proteína FGFR4 Arg^{388}, provavelmente interfira na interação do complexo ternário FGFR/FGF/HSPG, importante para engatilhar a transdução de sinais. Uma das causas possíveis consiste na desestabilização das forças de atrações eletrostáticas existentes entre as moléculas integrantes deste complexo ternário, que é mantido por interações iônicas; estrutura, topografia, conformação e ótimo contato van der Waals entre as cadeias de HSPG; disposição espacial dos aminoácidos carregados positivamente no sítio de ligação da HSPG com os diferentes FGFs (RAMAN et al., 2003).

Os HSPG são carregados negativamente (WONG e Burgess 1996) e dependendo da localização da substituição do aminoácido glicina (com carga neutra) pelo aminoácido arginina (carregado positivamente) na modificação conformacional do receptor, conseqüente desta substituição e que dá o fenótipo FGFR4 Arg^{388}, pode haver uma maior atração eletrostática no complexo devido ás diferenças das cargas das cadeias de HSPG (com carga negativa) e do aminoácido arginina (com carga positiva).

A meia vida dos FGFs é estabilizada pela interação FGF/HSPG, que protege FGF (BOILLY et al., 2000) e FGFR (WU et al., 2001) da degradação proteolítica. A força de atração existente entre as cargas das cadeias de HSPG (carregadas negativamente) e do aminoácido arginina (com carga positiva) podem aumentar ainda mais esta estabilização. No entanto, esta hipótese poderá ser confirmada apenas quando a cristalografia da interação FGFR Arg^{388}/FGF/HSPG estiver disponível.

O aumento do tempo da interação do complexo FGFR/FGF/HSPG, conferido pela atração eletrostática entre cargas opostas das cadeias de HSPG (carregadas negativamente) e do aminoácido arginina (com carga positiva), poderia explicar o aumento da expressão do RNA mensageiro encontrado nas células portadoras do alelo FGFR4 Arg^{388}. O aumento da expressão deste RNA mensageiro pode ocorrer também, por aumento de sua estabilidade conferida pelo fenótipo FGFR4 Arg^{388}.

As diferenças de respostas ao FGF nas células, podem estar relacionadas às mudanças nas taxas de FGFs ligados às células. O tempo da ativação do receptor, bem como a quantidade, qualidade e disponibilidade do ligante parece ter uma repercussão importante para o tipo de resposta celular observada (BOILLY et al., 2000).

Em células de câncer de mama, o heparan sulfato extracelular pode ajudar a direcionar o comportamento fenotípico das células por uma ativação diferencial dos FGFRs, pois foi visto que a migração celular dependia preferencialmente de como FGF-1 se associava aos cognatos. FGF-1 associa-se às glicosaminoglicanas heparan sulfato A (HSGAGA),

para mediar proliferação e migração celular via FGFR1/FGFR2 e o FGF-2 às glicosaminoglicanas heparan sulfato B (HSGAGB), para mediar proliferação por FGFR-1 (NURCOMBE et. al., 2000).

A heparina e os análogos de heparina fucoidan e dextran sulfato foram descritos como ativadores diretos do FGFR4, mas não no FGFR1. A heparina se liga com forte afinidade ao FGFR4 no domínio de imunoglobulina extracelular 2 (BIKFALVI et al, 1997). É provável que a modificação conformacional do receptor FGFR4 Arg^{388} deixe o domínio de ligação do FGFR4 com a heparina mais acessível á ação desta. Essa pode ser também, uma possível explicação para o aumento do RNA mensageiro das células que possuem o alelo FGFR4 Arg^{388}.

Em resumo, o CEC de cabeça e pescoço pode criar um ambiente hipóxico que induz a liberação de FGF-2. O FGF-2 pode se ligar receptor FGFR4 para induzir degradação de matriz, que é necessária para angiogênese e motilidade celular. A modificação conformacional, resultante da substituição do aminoácido glicina por arginina no códon 388, pode interferir na sinalização das moléculas de adesão mediadas por FGFR4; nos sítios de ação da heparina (um ativador direto do FGFR4), além de eventualmente desestabilizar as ligações eletrostáticas na tríade FGFR/ FGF/HSPG importante para engatilhar a transdução de sinais.

As alterações presentes em oncogenes e genes supressores tumorais constituem mecanismos chaves para a fase inicial do câncer, podendo levar á ativação do FGFR4. A presença do alelo FGFR4 Arg^{388} ou FGFR4 Gli^{388} pode ter um impacto decisivo no prognóstico destes pacientes, pois está presente desde o início da carcinogênese. Estudos prévios identificaram que o alelo FGFR4 Arg^{388} tem uma expressão aumentada em relação ao FGFR4 Gli^{388} e o nível de expressão possivelmente seja o grande diferencial entre os alelos para desencadear diminuição na sobrevida dos pacientes com câncer (MARIMOTO et al., 2003).

Os dados clínicos dos paciente com CEC de cabeça e pescoço associaram-se à presença do alelo FGFR4 Arg^{388}. Houve uma significativa diminuição da sobrevida nos indivíduos portadores deste alelo. O CEC de cabeça e pescoço muito freqüentemente é encontrado com metástases locorregionais ao diagnóstico. Muito provavelmente, este alelo esteja

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

envolvido neste comportamento pois está presente desde o início da carcinogênese interferindo nas sinalizações de degradação de matriz, necessárias para migração celular e angiogênese. É muito provável que ele esteja envolvido com o potencial metastático precoce de lesões iniciais e isso infere que a presença deste alelo possa definir a conduta do tratamento nas áreas de drenagem cervical, já que mostrou um valor prognóstico importante na população estudada. Um pior prognóstico foi observado após 24 meses para os pacientes portadores alelo FGFR4 Gli/Arg^{388} ou FGFR4 Arg^{388}se comparados aos FGFR4 Gli^{388}, o que poderia conduzir à uma terapêutica agressiva, que levaria a indicação de esvaziamento cervical mesmo quando o tumor primário for submetido a preservação de órgão. Possivelmente o alelo FGFR4 Arg^{388}, tenha impacto também na metastatização á distância. No entranto, seria necessário obter um seguimento mais longo do que o obtido nesta série.

PERSPECTIVAS

O FGFR4 possui atividade de quinase tirosina. Nos últimos anos este tipo de molécula tem sido muito estudada, pois constitui alvo candidato para o desenho de drogas. Medicamentos como Herceptina e Gleevec já disponíveis comercialmente, interferem na ação patológica das proteinoquinases e são utilizados nas terapias contra o câncer de mama e leucemia mielóide crônica, respectivamente (BANGE J. et al., 2002).

O alelo FGFR4 Arg^{388} mostrou ter um impacto importante nos paciente de CEC de cabeça e pescoço, servindo como um incentivo em abordagens terapêuticas que utilizam estes receptores.

6. CONCLUSÃO

O alelo FGFR4 Arg^{388} mostrou ter um impacto importante na diminuição da sobrevida dos pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço. Os resultados indicaram que este alelo possui grande valor prognóstico e que pode ser utilizado como um marcador de progressão do carcinoma espino celular de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ameyaw M.M., Tayeb M., Thornton N., Folayan G., Tariq M., Mobarek A., Evans D.A., Ofori-Adjei D. e Mc Lead H.L. *Ethnic variation in the HER-2 codon 655 genetic polymorphism previously associated with breast cancer.* Journal Human Genetic. 2002; 47(4):172-175.

Armstrong E., Partanen J., Cannizzaro L., Huebner K. and Alitalo K. *Localization of the Fibroblast Growth Factor Receptor-4 Gene Chromosome Region 5q33-qter* Genes, Chromosomes and Cancer 1992; 4: 94-98.

Bange Johannes, Prechtl D, Cheburkin Y, Spechet K, Harbeck N, Schimitt M, Knyazeva T, Müller, Gärtner S, Sures I, Wang H, Imyanitov E, Häring Hans-Ulrich, Knayzev P, Iacobelli Stefano, Höfler Heinz and Ullrich A. *Cancer Progression and Tumor Cell Motility are associated with the FGFR4 Arg^{388} Allele.* Cancer Research 2002; 62: 840-847.

Bellosta P., Iwahori A., Plotinikov A.N., Eliseenkova A. V, Basilico C and Mohammadi M. *Identification of Receptor and Heparin Binding Sites in Fibroblast Growth Factor 4 by Struture- Based Mutagenesis.* Molecular and Cellular Biology 2001; Sep: 5946-5957.

Beuchamp N. J., Daly M. E., Makris M., Preston F. E. and Peake I. R. *A Novel Mutation in Intron K of the PROS 1 Gene Causes Aberrant RNA Splicing and Is a Common Cause of Protein S Deficiency in a U K Thrombophilia Cohort.* Thromb Haemost 1998; 79: 1086-1091.

Beuchamp N. J., Daly M. E., Hampton K. K., Cooper P. C., Preston F. E. and Peake I. R. *High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U. K. population: relationship to activated protein C resistance and familial.* British Journal of Haematology 1994; (88): 219-222.

Bikfalvi A., Klein S. e Pintucci G. *Biologicals Roles of Fibroblast Growth Factor-2.* The Endocrine Society 1997; (18): 26-45.

Boilly B., Vercoutter-Edouart A. S., Houndermarck H., Nurcombe V., Bourhis X.L. *FGF signals for cell proliferation and migration trough different pathways.* Cytoquine and Growth Factor 2000 Reviews (11): 295-302.

Boyd D.D. Invasion and Metastasis in Head and Neck Cancer In Harrison L, Sessions R. e Hong W. - Head and Neck Cancer a Multidisciplinary Approach. Edit. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, 1999: 23-33.

Braakhuis J.M.B., Tabor M.P, Kummer J. A., Leemans R. e Brakenhoff R. H. *A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications.* Cancer Research 2003; (63) 1727-1730.

Brazell C., Freeman A. e Mosteller M. *Maximizing the value of medicines by including pharmacogenetic research in drug development and surveillance.* Br J Clinical Pharmacology 2002; (53): 224-231.

Brennan J. A., Boyle J. O., Kouch W. M., Goodman S. N., Hruban R. H., Eby Y. J, Couch M. J., Forastiere A. A., Sidransky D. *Association between cigarette smoking and mutation of the gene in squamous cell carcinoma of the head and neck.* The New England Journal of the medicine 1995; (March); 712-717.

Cabelguenne A., Blons H., Waziers I., Camot F., Houllier A. M., Soussi T., Brasnu D., Beaune P., Laccourreye O. e Laurent-Puig P. *P53 Alterations Predict Tumor Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Prospective Series.* Journal of Clinical Oncology 2000; 18 (7): 1465-1473.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Califano J., der Riet P., Westra W., Nawroz H., Clayman G., Piantadosi S., Corio R., Lee D., Greenberg B., Koch W. e Sidransky D. *Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization.* Cancer Research 1996; 56: 5488-5492.

Cavallaro U., Nierdermeyer J., Fuxa M. and Christofori Gerhard. *N-CAM Modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling.* Nature Cell Biology July 2001; Vol. 3:650-657.

Chakraborty S.B., Sabbir M.G., Roy A., Sengupta A. e Panda C.K. Multiple Deletions in Chromosome 3p are Associeted with the Development of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

Coombs N.J, Goughh A.C., Primrose J.N.. *Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin- fixed tissue.* Nuclei Acid Res 1999; 12- 27.

Cortesina G, Gabriele P, Giordano C, Merletti F, Morrison A, Hermelink HK, Palestro G, Sannazzari GL, Sartoris A and Sasco A. *Report of an international workshop on perspectives on secondary prevention of laryngeal cancer.* Eur J Cancer, 1993; 29A(9):1348-52.

Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., Schoen F.J. *Patologia Estrutural e Funcional. 5ª ed.* Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996: 239p.

Dellacono F.C., Spiro M.D., Eisma R.B.S., Kreutzer D. *Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptor by Head and Neck Squamous Carcinoma Tumor and Vascular Endothelial Cells.* The American Journal of Journal 1997; 174 (5): 540-544.

Dickson C., Spencer-Dene B., Dillon C. and Fantl V. *Tyrosine Kinase in Breast Cancer Fibroblast Growth Factors and Their Receptors.* Breast Cancer Research 2000; 2: 191-196.

Gervásio O.L.A.S.; Dutra R.A.; Tartaglia S.M.A.; Vasconcellos W. A.; Barbosa A.A.; Aguiar M.C.F. *Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective study of 740 Cases in a Brazilian Population.* Braz Dent J 2001; 12 (1): 57-61.

Gonzaléz M.V., Pello M.F., López- Larrea C., Suárez C., Menéndez M. J., and Coto E. *Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16(9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head nad neck.* Clinical Cancer Research 1995; (1) 1043-1049.

Hart K.C., Robertson SC, Kanemitsu M.Y., Meyer A.N., Tynan J. A., Donoghue D.J. *Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3 and FGFR4.* Oncogene 2000; (19): 3309-3320.

Hasina R, Hulett K, Bicciato S, Bello C. D., Petruzzelli G. J. and Lingen M. W. *Plasminogen ActivatorInhibitor-2: A molecular biomarker for Head and Neck Cancer Progression.* Cancer Research 2003; (63): 555-559.

Hiranuma H., Jikko A., Maeda T., Matumura S., Murakami S., Fukuda Y. *An analysis of the prognostic significance of p53 status for squamous cell carcinoma of the oral cavity treated by radiotherapy.* Oral Oncology 1998 (34), 513-518.

Holtrich U., Bräuninger A., Strebhardt K. and Waigmann H. R. *Two additional protein-tyrosine expressed in human lung: fourth member of the fibroblast growth receptor family and intracellular protein-tyrosine kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; (88): 10411-10415.

Huges S. *Differential Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor (FRGR) Multigene Family in Normal Human Adult Tissues.* The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1997; 45 (7):1005-1019.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) (http://www.inca.gov.br).

Iughetti P., Suzuki O, Godoi P.H.C., Alves V.A. F., Sertié A. L., Zorick T., Soares F., Camargo A., Moreira E., Loreto C., Moreira- Filho C. A., Simpson A., Oliva G. e Passos-Bueno M.R. *A polymorphism in Endostatin, na Angiogenesis Inhibitor for the Development of Prostatic Adenocarcinoma.* 2001; 61: 7375-7378.

Jeffers M., Shimkets R., Prayaga S., Boldog F., Yang M., Burgess C., Fernandes E., Rittman B., Shimkets J., LaRochelle W.J.and Lichenstein H.S. *Identification of a Novel Human Fibroblast Growth Factor and Characterization of its Role in Oncogenesis.* Cancer Research 2001; 61:3131-3138.

Jézéquel P., Campion L., Joalland M-P., Millour M., Dravet F., Classe J-M., Delecroix V., Depaporte R. *G388R mutation of thr FGFR4 gene is not relevant to breast cancer prognosis.* British Journal of Cancer 2004; 90: 189-193.

Joseph, Emmanuella and Baibak, Laurence. *Head and Neck Cancer: Squamous Cell Carcinoma.* www.emedicine.com/plastic/topic376htm. 2002.

Klint P., Cleaesson-Welsh L. *Signal Transduction by Fibroblast Growth Factor Receptors.* Frontiers in Bioscience 1999; (4): 165-177.

Kirk B.W., Feinsod M., Favis R., Kliman R.M. e Barany F. *Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease.* Nucleic Acids Research 2002; 30 (15): 3295-3311.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Lewin B.*GENES*. 7ª ed. Oxford. Estados Unidos da América, 2000: 901p.

Li Yan, Mangasarian K., Mansukhani A. and Basilico C. *Ativation of the Receptors by mutations in the transmembrane domain*. Oncogene 1997; 14: 1397-1406.

March A.R., Pinedo J.T., *Radical Neck Dissection*. www.emedicine.com/ent/topic502.htm

Marimoto Y., Ozaki T., Ouchida M., Umehara N., Ohata N., Yoshida A., Shimizu K., Inoue H. *Single Nucleotide Polymorphism in Fibroblast Growth Factor Receptor 4 at Codon 388 is Associated with prognosis in High-Grade Soft Tissue Sarcoma*. Cancer 2003; (15): 2245-2250.

Maula S.M., Luukkaa M., Grénman R., Jackson D., Jalkanen S. e Ristamäki R. *Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region*. Cancer Research 2003 (63): 1920-1926.

McKaig R.G., Baric R.S. and Olshan A.F. *Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology*. Head and Neck.1998; 20 (3): 250-265.

Mc Williams J.E., Evans A.J., Beer T.M., Andersen P.E., Cohen J.I., Everts E. C., Henner W. D.*Genetic Polymorphisms in Head and Neck Cancer Risk*. Head and Neck. 2000;Sep; 22 (6): 609- 617.

Meric F, Lee Wei-Ping, Sahin A., Zhang H, Kung H-J e Hung M. *Expression profile of tyrosine Kinase in Breast Cancer*. Clinical Cancer Research 2002; 8: 361-367.

Miralles F., Ron D., Baigest M., Félez J. e Muñoz-Cánoves P. *Differencial Regulation of Urokinase-type Plasminogen Activator Expression by Basic Fibroblast Growth Factor and Serum in Myogenesis.* The Journal of Biological Chemestry 1998; 273 (4): 2052-1998.

Myers E. N. and Suen J. Y. *Cancer of the Head and Neck.* 3ª ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania 1996: 321p.

Nagai M.A., Miracca E. C., Yamamoto L., Kowalski L. P., Brentani R.R. *TP53 mutations in upper aerodigestive squamous cell carcinomas from a group of Brazilian Patientes.* The American Journal of Surgery. 1995; 10: 492- 494.

Nagai M.A., Miracca E. C., Yamamoto L., Moura R. P., Simpson A J. G., Kowalski L. P., Brentani R.R. *TP53 Genetic alterations in head and neck carcinomas from Brasil.* Int. J. Cancer 1998; 76: 13 –18.

Nurcombe V., Smart C., Chipperfield H., Cool S.M., Boilly B e Hondermarck H. *The Proliferative and Migratory Activies of Breast Cancer Cells Can Be Differentially Regulated by Heparan Sulfates.* The Journal of Biological Chemestry 2000; 275 (39): 30009-30018.

Organização Mundial da Saúde (http://www.cancer.gov).

Parise O.J. *Câncer de boca aspectos básicos e terapêuticos.* 1ª ed. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. São Paulo, 2000. 13p, 72p, 97p.

Pintos J., Franco E.L., Kowalski L.P., Oliveira B.V. and Curado M.P. *Use wood stoves and risk of the upper aero-digestive tract: a case-control study.* International Journal of Epidemiology 1998; (27): 936-940.

Raman R., Venkataraman G., Ernst S., Sasisekharan V. e Sasisekharan R. *Strututal specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of protein.* PNAS 2003; 100 (5): 2357-2362.

Rapoport A., Kowalsky L.P., Herter N.T., BrandãoL.G. e Walder F. *Rastreamento, disgnóstico e tratamento do câncer de boca.* Sociedade Brasileira de cirurgia de cabeça e pescoço. Projeto Diretrizes 2001.

Rosée P. L., Corbin A.S., Stoffregen E. P., Deininger M. W. and Druker B. J. *Ativity of the Bcr-Abl Isoforms That Cause Resistance to Imatib Mesylate (Gleevec, STI571).* Cancer Research 2002; 62: 7149-7153.

Sambrook J. and Russel D. W. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* . Cold Spring Harbor Laboratory Press 3° edição, 2001; A2-6 ,A2-7, 8-13 a 8-16.

Shah J.P., Lydiatt W. *Treatment of Cancer of the Head Neck.* Cancer J Clin 1995 nov-dec;45(6): 352- 368.

Shibata Darryl. *Extraction of the DNA from Paraffin-Embedded Tissue for Analysis by Polymerase Chain Reaction: New Tricks from an Old Friend.* Human Pathology 1994; 25 (6): 561-563.

ShunJinang Y., Asa S. L., Ezzat S. *Fibroblast Growth Factor 4 Is a Target for the Zinc Finger Transcription Factor Ikaros in the Pituitary.* The Endocrine Society 2002; 16 (5): 1069-1078.

Takaishi S., Sawada T., Morita Y., Seno H., Fukuzawa H. and Chiba T. *Identification of a Novel Alternative Splicing of Human FGF Receptor 4: Soluble-Form Splice Variant Expressed in Human Gastrintestinal Epithelial Cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 267: 658- 662.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Terada M., Shimizu A., Sato N., Miyakaze S., Katayama H. and Kurokawa-Seo M. *Fibroblast GrowthFactor Receptor 3 Lacking the Ig IIIb and Transmembrane Domains Secreted from HumanSquamous Cell Carcinoma DJM Binds to FGFs.* Molecular Cell Biology ResearchCommunications 2001; (4): 365-373.

van Oijen M.G.C. e Slootweg P. J. *Oral Field Cancerization: Carcinogen-induced Independent Events or Micrometastatic Deposits?* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2000; (9): 249-256.

Wagman L.D., Hoskins W.J., Coia L. R. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 7ª ed. The Oncology Group 2003. ISBN 8317-X.

Wong P. e Burgess W. H. *FGF2-Heparin Co-crystal Complex-assisted design of Mutants FGF1 with Predictable Heparin Affinities.* The Journal of Biology Chemestry 1996; 273 (29): 18617-18622.

Xie M. H., Holcomb I., Deuel B., Dowd P., Huang A ., Vagts A., Foster J., Liang J., Brush J., Gu Q., Hillan K., Goddard A., Gurney A. L. *FGF-19, a Novel Fibroblast Growth Factor With Unique Specificity for FGFR4.* Cytokine 1999; 11: 729-735.

Zwick E., Bange J. and Ullrich A . *Receptor Tyrosine Kinase as Target for anticancer drugs.* Trends in Molecular Medicine 2002; Jan; 8 (1) :17-23.